

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JÉSSICA COCCO

RELAÇÕES TRI-TRÓFICAS EM MILHO TRANSGÊNICO ENVOLVENDO LEPIDÓPTEROS
PRAGAS E SEUS INIMIGOS NATURAIS EM MILHO TRANSGÊNICO

CURITIBA

2019

JÉSSICA COCCO

RELAÇÕES TRI-TRÓFICAS EM MILHO TRANSGÊNICO ENVOLVENDO LEPIDÓPTEROS
PRAGAS E SEUS INIMIGOS NATURAIS EM MILHO TRANSGÊNICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção
do título de Doutor em Zoologia.

Orientador: Dr. Luís Amilton Foerster

CURITIBA
2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Cocco, Jéssica

Relações tri-tróficas em milho transgênico envolvendo lepidópteros
pragas e seus inimigos naturais em milho transgênico. / Jéssica Cocco. –
Curitiba, 2019.

102 p.: il.

Orientador: Luís Amilton Foerster

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Milho - Doenças e pragas 2. Plantas transgênicas 3. Relação inseto
- planta 4. Sobrevivência 5. Reprodução I. Título II. Foerster, Luís Amilton
III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

CDD (22. ed.) 632.7
595.7



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOLOGIA -
40001016008P4

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JÉSSICA COCCO** intitulada: **Relações tritróficas em milho transgênico envolvendo Lepidópteros pragas e seus inimigos naturais em milho transgênico**., após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 18 de Fevereiro de 2019.

LUÍS AMILTON FOERSTER
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

CELSONO OMOTO
Avaliador Externo (USP)

ALESSANDRA REGINA BUTNARIU
Avaliador Externo (UNEMAT)

BEATRIZ SPALDING CORREA FERREIRA
Avaliador Externo (FUNARBE)

Aos meus pais Ildo José Cocco e Angela Maria Giuliani Cocco.

AGRADECIMENTOS

“Se A é sucesso, então A é igual a X mais Y mais Z.” (Albert Einstein)

Então o trabalho é X; Y é o lazer e Z são as pessoas.

Neste momento quero agradecer as variáveis X e Z:

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio em forma de bolsa.

Aos Professores Dr^a. Alessandra Regina Butnariu, Dr^a. Beatriz Spalding Corrêa Ferreira, Dr. Celso Omoto, por aceitarem participar da banca de defesa e contribuir com meu trabalho.

Aos membros da minha comissão de acompanhamento Dr^a. Alessandra Regina Butnariu, Dr^a. Beatriz Spalding Corrêa Ferreira e Dr. César Augusto Marchioro, pela dedicação e por contribuírem com a minha formação.

Ao meu orientador Luís Amilton Foerster, por aceitar me orientar, pela confiança, paciência e dedicação comigo ao longo do doutorado. Muito Obrigada Professor!

Aos taxonomistas que identificaram os exemplares da ordem Lepidoptera Dr. Eduardo Carneiro e Dr. Diego Rodrigo Dolibaina, da família Ichneumonidae Dr^a Helena C. Onody e Dr. Daniel Fernandes, da família Braconidae Dr. Eduardo Shimbori e Dr^a Angélica Penteado Dias, e da ordem Dermaptera Dr. Aldeni B. da Silva.

Aos Proprietários da Fazenda Canarinho, por permitirem realizar os experimentos e pelo suporte no desenvolvimento do projeto.

À Agrocát de Diamantino por fornecer um híbrido de milho.

Aos Professores, secretária e colegas do Programa de Pós-Graduação de Zoologia da UFPR, pela convivência.

Aos meus colegas do Laboratório de Controle Integrado de Insetos, Tamara, Guilherme, Pâmela, Juliane, Fernanda, Dr^a Marion, por contribuir com meu trabalho nas discussões durante o doutorado.

A Wuglenya por me ajudar no trabalho de campo e laboratório.

Aos meus ex-professores Diogo e Augusta, sempre me ajudaram.

Quanto a variável Y, gostaria de agradecer todos os meus familiares, primos, tios e meus avós, muito obrigada por me incentivarem. Em especial aos meus pais, Ildo e Angela, e aos meus irmãos Juliana e Junior e minha sobrinha Heloísa, que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente! A vocês meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade.

A minha família tangaraense: que me acolheu e me deu apoio durante o doutorado, em especial a Tassia, Rose, Cezar, Erick, Kenedy, Jéssica R. e Juarez, pelos momentos agradáveis e pelo apoio.

À família curitibana Amanda, Pedro, Veronica, Theodoro, Fernando, Claudia, Mariana, Daniel e os integrantes do Pedal Cajuru, por tornarem minha moradia Curitiba muito agradável.

E claro que não posso deixar de agradecer, Higor Vendrame Ribeiro, que acompanhou de perto minha dedicação, esforço e empenho para concluir este trabalho. Sempre acreditando na minha capacidade mesmo quando nem eu acreditava que conseguiria. E que me ajudou no trabalho de campo e laboratório. Muito obrigada querido pelo seu companheirismo.

A Deus, ao Universo e ao Destino, que permitiram que tudo isso acontecesse.

Finalmente gostaria de agradecer a todos que torceram por mim:

Muito Obrigada!

RESUMO

O milho transgênico resistente a insetos tem sido amplamente utilizado no mundo para o controle de pragas. No entanto populações de insetos resistentes tem aumentado causando perda da efetividade da tecnologia. Além disso, estudos sobre os efeitos dessas plantas sobre organismos não alvo são controversos. Nesse sentido avaliamos os efeitos de híbridos comerciais de milho transgênico YieldGard (Cry1Ab), YieldGard VTPRO (Cry1A.105 + Cry2Ab2) e Viptera (Vip3Aa20), e um híbrido não transgênico BM207 (controle), nas relações tróficas em campo. A partir dos resultados obtidos no campo, foram realizados ensaios em laboratório, para compreender os efeitos dos híbridos Bt sobre a sobrevivência, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), do parasitoide *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) e do predador *Euborellia annulipes* (Dermaptera: Anisolabididae). Sendo que os ensaios para o predador *E. annulipes* foram realizados com dois tipos de dieta; lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com os híbridos (presa) e pólen + presa (dieta mista). Os ensaios de campo foram realizados em Nortelândia-MT; *S. frugiperda* foi tolerante aos híbridos YieldGard e YieldGard VTPRO, porém suscetível ao híbrido Viptera. No híbrido Viptera houve a ocorrência de três espécies de *Leucania* e três espécies de *Elaphria*, sendo esta a primeira citação desses gêneros em milho Bt no Brasil. As populações de parasitoides e predadores foram afetadas negativamente nos híbridos YieldGard VTPRO e Viptera. Os principais parasitoides de *S. frugiperda* foram *Eiphosoma laphygmae* (Hymenoptera, Ichneumonidae), *Dolichozele* sp. (Hymenoptera: Braconidae) e *Archytas incertus* (Diptera: Tachinidae). Lagartas de *Leucania* foram parasitadas por seis espécies de Braconidae e duas espécies de Tachinidae. Não foi registrado parasitismo em lagartas de *Elaphria* spp. Em laboratório houve 100% de mortalidade das lagartas de *S. frugiperda* no híbrido Viptera, no entanto, as lagartas sobreviveram aos híbridos Bt YieldGard e YieldGard VTPRO. Ambos os híbridos afetaram o período larval e pupal e o peso das lagartas e pupas. A fecundidade foi menor nas fêmeas emergidas das larvas criadas nos híbridos YieldGard e YieldGard VTPRO em relação ao controle, mas não houve diferença na viabilidade dos ovos entre os tratamentos. Os ensaios em laboratório com os inimigos naturais não foram realizados para o híbrido Viptera devido à alta mortalidade de *S. frugiperda* nesse híbrido. Os híbridos transgênicos YieldGard e YieldGard VTPRO causaram maior mortalidade às lagartas de *S. frugiperda* parasitadas por *C. sonorensis* e alteraram o período de desenvolvimento larval, pupal, o peso das pupas e a fecundidade das fêmeas do parasitoide, em relação ao híbrido convencional. A longevidade dos adultos do parasitoide não foi estatisticamente diferente entre os híbridos testados. A sobrevivência de ninfas e adultos de *E. annulipes* não foi afetada pelos híbridos, quando estes foram alimentados apenas com presas. No entanto, quando a alimentação foi à base de dieta mista, a sobrevivência das ninfas e adultos de *E. annulipes* foi menor nos dois híbridos transgênicos. O tempo de desenvolvimento das ninfas do predador foi mais longo em todos os tratamentos com plantas Bt. A longevidade dos adultos, foi menor nos dois híbridos transgênicos, em relação ao controle, apenas na dieta mista. Indivíduos que se alimentaram da dieta mista produziram menor número de ovos do que o tratamento controle, porém a viabilidade dos ovos não foi estatisticamente diferente nos híbridos Bt e controle, nas duas dietas avaliadas. Em conclusão, observamos que os híbridos Bt alteraram a composição da estrutura trófica, como a presença de lagartas de *Leucania* e *Elaphria* no híbrido Viptera, e redução da população de inimigos naturais nos híbridos YieldGard e Viptera. Em laboratório foram observados efeitos negativos dos híbridos YieldGard e YieldGard VTPRO no desenvolvimento de parasitoide larval *C. sonorensis* e no predador *E. annulipes*.

Palavras-chave: Milho Bt, pólen, tesourinha, parasitoide, sobrevivência, reprodução, Cry, Viptera

ABSTRACT

Transgenic maize resistant to insects has been widely used in the world for lepidopteran pest control. However, populations of insect pests have increased causing loss of effectiveness of the technology. Moreover, studies on the effects of these plants on non-target organisms are controversial. We evaluated the effects of the commercial transgenic maize hybrids YieldGard (Cry1Ab), YieldGard VTPRO (Cry1A.105 + Cry2Ab2) and Viptera (Vip3Aa20) and a non-transgenic hybrid BM207 (control) in field and laboratory trophic relationships. From the results obtained in the field, laboratory tests were carried out to analyze the effects of Bt hybrids on the survival, development and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), the parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) and the predator *Euborellia annulipes* (Dermaptera: Anisolabididae). The tests for the predator *E. annulipes* were performed with two types of diet; *S. frugiperda* caterpillars fed hybrids (prey) and pollen + prey (mixed diet). Field trials were conducted in Nortelândia-MT; *S. frugiperda* was tolerant to YieldGard and YieldGard VTPRO hybrids but susceptible to the Viptera hybrid. In the Viptera hybrid three species of *Leucania* and three species of *Elaphria* were collected for the first time in Bt maize in Brazil. Populations of parasitoids and predators were negatively affected in the YieldGard VTPRO and Viptera hybrids. The main parasitoids of *S. frugiperda* were *Eiphosoma laphygmae* (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Dolichozele* sp. (Hymenoptera: Braconidae) and *Archytas incertus* (Diptera: Tachinidae). *Leucania* caterpillars were parasitized by six species of Braconidae and two species of Tachinidae. No parasitism was recorded on *Elaphria* spp. In the laboratory there was 100% mortality of *S. frugiperda* caterpillars in the Viptera, however, the caterpillars survived in the Bt YieldGard and YieldGard VTPRO hybrids. Both hybrids affected the larval and pupal period and the weight of caterpillars and pupae. Fecundity was lower in emerged females of larvae reared on YieldGard and YieldGard VTPRO hybrids compared to control, but there was no difference in egg viability between treatments. Laboratory tests with the natural enemies were not performed for the Viptera hybrid, due to the high mortality of *S. frugiperda* in this hybrid. Transgenic hybrids YieldGard e YieldGard VTPRO caused higher mortality to *S. frugiperda* caterpillars parasitized by *C. sonorensis* in relation to control. The YieldGard VTPRO and YieldGard transgenic hybrids altered larval and pupal development, pupal weight and females' fecundity of the parasitoid. Longevity was not statistically different between the tested hybrids. The survival of nymphs and adults of *E. annulipes* was not affected by the hybrids when they were fed only preys. However, when feeding was based on the mixed diet, the survival of nymphs and adults of *E. annulipes* was lower in the two transgenic hybrids. The development time of predator nymphs was longer in all treatments with Bt plants. The longevity of the adults, until the evaluated period, was lower in the three transgenic hybrids, in relation to the control, only in the mixed diet. However, the viability of the eggs was not statistically different in the Bt and control hybrids in the two diets evaluated. In conclusion, we observed that the Bt hybrids altered the composition of the trophic structure, for example the presence of *Leucania* and *Elaphria* caterpillars in the Viptera hybrid, and reduction of the natural enemy population in the YieldGard VTPRO and Viptera hybrids. Negative effects of the YieldGard and YieldGard VTPRO hybrids were observed on the development and reproduction of the larval parasitoid *C. sonorensis* and on the predator *E. annulipes*.

Key-words: Bt maize, pollen, earwig, parasitoid, survival, reproduction, Cry, Viptera

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1- Relações tri-tróficas em milho Bt.....20

Figura 1. Média de lagartas de *Spodoptera frugiperda* por coleta (barra \pm erro padrão) em Nortelândia-MT, na segunda safra de milho em 2016 e 2017. (Letras minúsculas comparações entre os tratamentos em 2016 e as letras maiúsculas comparações entre os tratamentos em 2017, segundo análise de ScottKnott 0,05% de probabilidade).25

Figura 2. Média de *Elaphria* spp. e *Leucania* spp. por coleta (barra \pm erro padrão) em Nortelândia-MT, na segunda safra de milho em 2016 e 2017. (Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre os híbridos para *Leucania* spp., e para *Elaphria* spp. não houve significância, ScottKnott 0,05% de probabilidade).26

Figura 3. Média de lagartas de *Spodoptera frugiperda* parasitadas em cada coleta (barra \pm erro padrão), na segunda safra de milho de de 2016 e 2017 em Nortelândia-MT. (Letras minúsculas comparações entre os tratamentos em 2016 e as letras maiúsculas comparações entre os tratamentos em 2017, segundo análise de ScottKnott 0,05% de probabilidade).29

Figura 4. Ocorrência do predador *Euborellia annulipes*, em híbrido de milho Bt e não-Bt na segunda safra de 2016 e 2017 em Nortelândia, Mato Grosso-Brasil. (Média seguidas pela mesma letra dentro de cada safra não diferem estatisticamente segundo teste de ScottKnott a 5%).30

Capítulo 2- Effect of three insect-resistant transgenic maize introductions on the development and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).....41

Figure 1. Survival of *Spodoptera frugiperda* fed in the larval stage on leaves of transgenic and conventional maize.46

Figure 2. Effect of transgenic maize on the weight of seven day-old larvae (a) and pupae (b) of *Spodoptera frugiperda*. Means with the same letter for larval weight did not differ significantly by the generalized linear model and for Tukey's test for pupal weight ($p \leq 0.05$).47

Figure 3. Effect of Bt maize on the fecundity and fertility of *Spodoptera frugiperda*. Means with the same letter did not differ significantly by contrast analysis ($p \leq 0.05$). 48

Capítulo 3- Efeito de dois híbridos de milho Bt sobre o desenvolvimento e a reprodução do parasitoide larval *Campoletis sonorensis* (Cameron, 1886) (Hymenoptera: Ichneumonidae)..60

Figura 1. Sobrevivência de *Campoletis sonorensis* em lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com híbridos de milho transgênicos e não transgênico..... 66

Figura 2. Peso das pupas de *Campoletis sonorensis* após o desenvolvimento em lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com híbridos de milho Bt e não transgênico. Médias (\pm erro padrão) com a mesma letra não diferem significativamente por modelo linear generalizado a 0,05%. 67

Figura 3. Longevidade de *Campoletis sonorensis* em *Spodoptera frugiperda* alimentadas com híbridos Bt e não Bt. Médias (\pm erro padrão) seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste T em relação à longevidade entre os sexos em cada híbrido.† não houve diferença para a longevidade de machos e fêmeas entre os tratamentos..... 68

Figura 4. Média do parasitismo diário de *Campoletis sonorensis*. As médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo modelo linear generalizado a 0,05%. 69

Capítulo 4- Efeito de híbridos de milho Cry sobre a sobrevivência, o desenvolvimento e reprodução do predador *Euborellia annulipes* (Lucas, 1847) (Dermaptera: Anisolabididae)...78

Figura 1. Efeito de presas provenientes de híbridos Bt no número de ovos produzidos (a) e no número de ovos viáveis (b) de *Euborellia annulipes*. 85

Figura 2. Efeito da dieta mista no número de ovos produzidos (a) e de ovos viáveis (b) de *Euborellia annulipes*. 87

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1- Relações tri-tróficas em milho Bt.....	20
Tabela 1. Número total de lagartas coletadas nos híbridos de milho em Nortelândia, Mato Grosso- Brasil.	25
Tabela 2. Número total de parasitoides coletados em lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Leucania</i> spp. nos híbridos de milho em Nortelândia, Mato Grosso-Brasil.	28
Tabela 3. Número de predadores dermápteros coletados nos híbridos em Nortelândia, Mato Grosso- Brasil.	30
Capítulo 2- Effect of three insect-resistant transgenic maize introductions on the development and reproduction of <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).....	41
Table 1. Biological parameters of <i>Spodoptera frugiperda</i> surviving on transgenic maize expressing <i>Bacillus thuringiensis</i> Cry and Vip proteins (temperature de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 70% RH and fotoperíod of 14:10 h).	46
Capítulo 3- Efeito de dois híbridos de milho Bt sobre o desenvolvimento e a reprodução do parasitoide larval <i>Campoletis sonorensis</i> (Cameron, 1886) (Hymenoptera: Ichneumonidae)..	60
Tabela 1. Parâmetros biológicos de <i>Campoletis sonorensis</i> desenvolvida em lagartas de <i>Spodoptera</i> <i>frugiperda</i> alimentadas com híbridos de milho Bt e não transgênico.....	67
Capítulo 4- Efeito de híbridos de milho Cry sobre a sobrevivência, o desenvolvimento e reprodução do predador <i>Euborellia annulipes</i> (Lucas, 1847) (Dermaptera: Anisolabididae)...	78
Tabela 1. Parâmetros biológicos de <i>Euborellia annulipes</i> predando lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com milho Bt e não-transgênico.	84
Tabela 2. Parâmetros biológicos de <i>Euborellia annulipes</i> se alimentando de lagartas e pólen de milho Bt e não-transgênico.....	86

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
CAPÍTULO 1: RELAÇÕES TRI-TRÓFICAS ENVOLVENDO LEPIDÓPTEROS PRAGAS, PARASITOIDES E PREDADORES EM MILHO TRANSGÊNICO.....	20
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1. <i>Experimentos de campo</i>	23
2.2. <i>Coleta de lagartas e inimigos naturais</i>	24
2.3. <i>Análise estatística</i>	24
3. RESULTADOS.....	24
3.1. <i>Lagartas</i>	24
3.2. <i>Parasitoides larvais</i>	27
3.3. <i>Predadores</i>	29
4. DISCUSSÃO.....	31
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
CAPÍTULO 2: EFFECT OF THREE INSECT-RESISTANT TRANSGENIC MAIZE INTRODUCTIONS ON THE DEVELOPMENT AND REPRODUCTION OF <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)	41
1. INTRODUCTION.....	42
2. MATERIAL AND METHODS.....	44
2.1. <i>Insect and plant cultures</i>	44
2.2. <i>Influence of the maize hybrids on <i>S. frugiperda</i></i>	44
2.3. <i>Statistical analysis</i>	45
3. RESULTS.....	45
4. DISCUSSION.....	48
5. REFERENCES.....	52
CAPÍTULO 3: EFEITO DE DOIS HÍBRIDOS DE MILHO BT SOBRE O DESENVOLVIMENTO E A REPRODUÇÃO DO PARASITOIDE LARVAL <i>CAMPOLETIS SONORENSIS</i> (CAMERON, 1886) (HYMENOPTERA: ICHNEUMONIDAE)	60
1. INTRODUÇÃO.....	62
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	63
2.1. <i>Material vegetal</i>	63
2.2. <i>Criação de <i>S. frugiperda</i> e <i>C. sonorensis</i></i>	63
2.3. <i>Desenvolvimento de <i>C. sonorensis</i> em lagartas de <i>S. frugiperda</i> em milho transgênico e não transgênico</i>	64
2.4. <i>Análise estatística</i>	65
3. RESULTADOS.....	65
4. DISCUSSÃO.....	69
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
CAPÍTULO 4: EFEITO DE HÍBRIDOS DE MILHO CRY SOBRE A SOBREVIVÊNCIA, DESENVOLVIMENTO E REPRODUÇÃO DO PREDADOR <i>EUBORELLIA ANNULIPES</i> (LUCAS, 1847) (DERMAPTERA: ANISOLABIDIDAE)	78
1. INTRODUÇÃO.....	79
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	81
2.1. <i>Material vegetal e coleta de pólen</i>	81
2.2. <i>Insetos</i>	81
2.3. <i>Efeito do milho Bt sobre o desenvolvimento e reprodução de <i>E. annulipes</i> por meio de uma dieta à base de presas</i>	82
2.4. <i>Efeito do milho Bt sobre o desenvolvimento e reprodução de <i>E. annulipes</i> por meio de uma dieta mista</i>	83
2.5. <i>Análise estatística</i>	83
3. RESULTADOS.....	84

3.1. Efeito do consumo de lagartas criadas em milho Bt sobre o desenvolvimento e reprodução de <i>E. annulipes</i>	84
3.2. Efeito do consumo de lagartas e pólen de milho Bt sobre o desenvolvimento e reprodução de <i>E. annulipes</i>	85
4. DISCUSSÃO	87
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
2. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
3. REFERÊNCIAS	98

1. Introdução Geral

Os agroecossistemas são sistemas simplificados em relação aos ecossistemas naturais, apresentando instabilidade nas interações entre os níveis tróficos, alteração na estrutura biótica e na composição das comunidades ecológicas (Hooper et al. 2005). Na agricultura ocorre uma grande disponibilidade de alimento (produtores, como algodão, milho e soja) diminuindo a competição e a mortalidade dos insetos herbívoros (primeiro nível trófico) e causando o aumento populacional desses organismos (Andren et al. 1988). No entanto, os agentes de controle natural desses insetos não encontram as condições ideais dentro do sistema agrícola para realizarem o controle dos herbívoros e reduzir o seu nível populacional (Thuler, 2008). Deste modo a população de herbívoros excede repetidamente o nível tolerável das plantas, reduzindo sua produtividade (Azeredo et al. 2004), necessitando que haja intervenção humana para a redução do nível populacional, a fim de manter a produtividade das culturas (Altieri, 1999; Prokopy e Kogan, 2009).

O controle de insetos praga na agricultura pode ser realizado por meio de uma variedade de táticas de manejo, incluindo o controle biológico, controle químico e plantas geneticamente modificadas (Bottrell e Smith, 1982; Babu et al. 2003). O controle biológico é realizado utilizando organismos presentes no ambiente, como predadores, parasitoides, patógenos (*Baculovirus*, *Bacillus thuringiensis* e fungos) e nematoides entomoparasitas (Cardinale et al. 2003; Cory e Franklin, 2012; Roderick et al. 2012). O controle químico é realizado por inseticidas piretróides, organofosforados, carbamatos, neonicotinóides e reguladores de crescimento (Yu, 2006; Casida, 2009). As plantas geneticamente modificadas recebem genes de outros organismos (Zadoks e Waibel, 2000) e abrangem construções que incluem resistência a herbicidas, a insetos e a patógenos virais (Hails, 2000).

Entre as diversas táticas de regulação das populações de insetos-praga mencionadas, o controle biológico apresenta diversas vantagens econômicas e ambientais, pois reduz a perda de produtividade sem causar prejuízos à qualidade do ambiente e à saúde dos seres vivos (Östman et al. 2003). Porém existe baixa adesão entre os produtores ao método biológico em relação ao controle químico (Van Lenteren, 2012), por diferentes razões; a indústria não considera o controle biológico como um produto viável para o comércio, por ser um produto efêmero; o histórico de uso de pesticidas pelos agricultores; o baixo estímulo das instituições governamentais para incentivar o uso de alternativas ao controle químico e a grande quantidade de regulamentação sobre coleta e uso de agentes de controle biológico, são fatores que dificultam o seu uso (Van Lenteren, 2012).

O controle químico é a principal forma de controle de pragas utilizada na agricultura; seu uso crescente e intenso resultou em uma série de efeitos indesejáveis (Hladik et al. 2014), como a resistência de insetos, poluição ambiental, surtos de pragas secundárias (Casida e Quistad, 1998;

Devine e Furlong, 2007) e à saúde humana como intoxicação de trabalhadores que manipulam estes produtos, mortalidade por câncer na população infanto-juvenil com exposição aos agrotóxicos e contaminação do leite materno (Londres, 2011; Curvo et al. 2013).

As plantas transgênicas tiveram rápida adoção na agricultura e horticultura (Zadoks e Waibel, 2000). As primeiras plantas transgênicas resistentes a insetos foram produzidas em 1987, quando plantas de tabaco foram produzidas expressando genes da toxina Cry presente na bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner (Vaeck et al. 1987). Posteriormente foram desenvolvidas plantas transgênicas com diferentes proteínas Cry e com novas proteínas inseticidas (Yu et al. 2011). Em 1995, houve a liberação comercial das cultivares transgênicas de milho Bt e algodão Bt nos EUA, (James e Krattiger, 1996). No Brasil, em 2003, foi liberado o uso comercial da soja transgênica Round-Up Ready, que confere resistência ao herbicida glifosato pela ação da enzima EPSPS (5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase) (Monquero, 2005). No ano de 2008 foi liberado no Brasil o milho transgênico MON 810 expressando a proteína Cry1Ab proveniente de *B. thuringiensis* (Okumura et al. 2013; Waquil et al. 2014).

As culturas expressando proteínas inseticidas da bactéria *B. thuringiensis* atuam no controle dos principais insetos-praga (Bravo et al. 2007). Existem dois grupos principais de proteínas Bt com atividade inseticida (Gatehouse, 2008): (1) as proteínas produzidas na fase de esporulação, que compreendem as proteínas cristais (Cry) e citolíticas (Cyt), e (2) as proteínas inseticidas sintetizadas durante a fase de crescimento vegetativo (Estruch et al. 1996), compreendendo as proteínas inseticidas vegetativas (Vip) e inseticidas secretadas (Sip) (Donovan et al. 2006). O controle da praga ocorre por meio da ingestão da proteína presente nas plantas Bt; o modo de ação varia de acordo com cada família de proteína (Schnepf et al. 1998; Lee et al. 2003). O modo de ação das proteínas Cry e Cyt ocorre pela ativação dos cristais por reações proteolíticas, os quais se ligam a receptores específicos localizados na membrana celular do intestino médio do inseto, formando poros (Schnepf et al. 1998; Bravo et al. 2007) e levando à lise celular e morte dos insetos (Palma et al. 2014). O modo de ação das proteínas Vip é semelhante ao das proteínas Cry, embora não compartilhem os receptores de ligação no intestino médio (Estruch et al. 1996; Lee et al. 2003; Rang et al. 2005).

As culturas transgênicas resistentes a insetos apresentam benefícios ao ambiente e a saúde humana pela redução no uso de inseticidas neurotóxicos, possibilitando um aumento na população de inimigos naturais (Betz et al. 2000; Shelton et al. 2002), ainda que existem evidências de que as plantas transgênicas possam afetar negativamente a sobrevivência de inimigos naturais, como abordado por Lövei e Arpaia (2005) e Harwood et al. (2005).

Os efeitos negativos aos inimigos naturais (parasitoides e predadores) podem ser diretos, via exposição e alimentação de resíduos de plantas, folhas senescentes, pólen, sementes, nectários florais,

seiva do floema, ou indiretamente via exposição ao hospedeiro ou presa sucessível à planta transgênica (Faria et al. 2006).

O pólen é uma fonte de alimento para polinizadores e artrópodes entomófagos, rica em nutrientes, possuindo altos proteínas e óleo, superiores a maioria dos tecidos vegetativo e algumas presas. A maioria dos predadores e parasitoides consomem pólen, contribuindo com seu desenvolvimento e reprodução (Lundgren, 2009, Schuldiner-Harpaz e Coll, 2017). Podemos citar as famílias: Formicidae and Vespidae (subfamilias Eumeninae, Masarinae, Polistinae, Vespinae) (Hymenoptera), Carabidae e Coccinellidae (Coleoptera), Chrysopidae e Hemerobiidae (Neuroptera), Mantidae (Mantodea), Anthorcoridae, Nabidae e Reduviidae (Heteroptera), Syrphidae (Diptera), Forficulidae e Anisolabididae (Dermaptera) (Lundgren, 2009). Incluir essa fonte de alimento em análises tróficas tornam-se importantes, em especial nos agroecossistemas, que possuem relações simplificadas e exposição a presas e hospedeiros nutricionalmente inadequados, em relação aos sistemas naturais (Kefi et al. 2012).

Parasitoides são mais propensos aos efeitos das plantas transgênicas do que predadores, uma vez que parasitoides exploram um pequeno número de espécies de hospedeiros e suas larvas normalmente não são capazes de procurar um novo hospedeiro, caso o hospedeiro disponível não seja adequado (Bernal et al. 2004). Dessa forma, se o hospedeiro morrer antes do parasitoide completar o ciclo, este também morre porque todos os recursos para o seu desenvolvimento derivam da alimentação do hospedeiro (Harvey e Strand 2002). Além dos efeitos negativos à fase larval, as plantas transgênicas podem desenvolver efeitos sub-letais nos parasitoides, como adultos mais leves, menos aptos e com baixa fecundidade (Bernal et al. 2004).

O amplo uso de plantas Bt tem favorecido o aumento de resistência dos insetos-alvo (Tabashnik et al. 2003; Romeis et al. 2008) e provocado surtos de pragas secundárias que ocupam o nicho previamente ocupado pelas espécies primárias que são efetivamente controladas pelas proteínas tóxicas expressas em plantas Bt (Catarino et al. 2015). Assim, fica evidente a necessidade de se adotar estratégias para a gestão de resistência e protocolos de biossegurança, bem como desenvolver estratégias de conscientização pública, para garantir a implantação adequada das plantas transgênicas (Kumar et al. 2008), respeitando as recomendações de uso, como a área refúgio (Frutos et al. 1999). Além disso a durabilidade das culturas transgênicas pode ser assegurada utilizando as práticas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Ranjekar et al. 2003), uma vez que o MIP retarda o desenvolvimento de resistência em insetos, prolongando a vida útil das culturas transgênicas (Cannon, 2000; Kumar et al. 2008).

Atualmente as plantas transgênicas ocupam 185 milhões de hectares no mundo (James, 2016), principalmente nos Estados Unidos, Brasil, Argentina, Canadá e Índia. O Brasil apresentou o maior

crescimento da área plantada (4,9 milhões de hectares) dessa tecnologia em 2016 e as principais culturas são soja, milho e algodão (James, 2016). Dentre essas culturas o milho Bt é a segunda cultura transgênica mais cultivada no Brasil ocupando uma área de 5,7 milhões de hectares (James, 2016).

O Estado do Mato Grosso se destaca na produção de grãos e é o segundo maior produtor de milho (Companhia Nacional de Abastecimento- CONAB, 2019). As plantas transgênicas viabilizaram o controle das principais pragas responsáveis pela redução da produtividade dessa cultura, a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) e a lagarta-da-espiga, *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera, Noctuidae). No entanto, a resistência de *S. frugiperda* foi observada para proteínas Cry no Brasil (Okumura et al. 2013; Omoto et al. 2016; Blanco et al. 2016), nos Estados Unidos (Williams et al. 1998), em Porto Rico (Storer et al. 2012), e no Paraguai (Gomez et al. 2017).

Além de selecionar linhagens resistentes de lepidópteros praga, plantas transgênicas podem afetar seus parasitoides e predadores, conforme mencionado anteriormente. Diversos parasitoides foram registrados utilizando *S. frugiperda* como hospedeiro, como os himenópteros, das famílias Trichogrammatidae, Scelionidae e Braconidae parasitando ovos de *S. frugiperda* (Ashley, 1986; Andrews, 1988; Molina-Ochoa et al. 2003). À lagarta-do-cartucho foram associados cerca de 14 gêneros de Hymenoptera (Braconidae, Ichneumonidae, Eulophidae) principalmente os gêneros *Chelonus*, *Cotesia*, *Eiphosoma* e *Campoletis* (Ashley, 1986; Andrews, 1988; Molina-Ochoa et al. 2003) e 16 espécies de Diptera (Tachinidae e Sarcophagidae), em especial os gêneros *Winthemia*, *Archytas* e *Sarcophaga* (Andrews, 1988; Molina-Ochoa et al. 2003; Wyckhuys e O'Neil, 2006). *Campoletis sonorensis* Cameron (Hymenoptera: Ichneumonidae) é um parasitoide larval solitário e generalista de lepidópteros que tem apresentado frequente parasitismo natural de *S. frugiperda* (Gross e Pair, 1986; Valicente e Barreto, 1999; Hoballah et al. 2004; Wyckhuys e O'Neil, 2006).

Os dermápteros estão entre os principais predadores de *S. frugiperda*, principalmente os gêneros *Doru* (Isenhour, 1986; Reis et al. 1988; Hoballah et al. 2004; Wyckhuys e O'Neil, 2006), *Euborellia* e *Forficula* (Wyckhuys e O'Neil, 2006). *Euborellia annulipes* (Lucas) (Dermaptera: Anisolabididae) tem hábitos generalistas e ampla distribuição geográfica, além de potencial de controle de *S. frugiperda* (Silva et al. 2010; Silva, 2015).

Os inimigos naturais além de atuarem como agentes naturais de mortalidade das pragas, também podem contribuir para retardar a evolução da resistência de *S. frugiperda* às plantas Bt (Bates et al. 2005). Neste contexto, investigar os efeitos de plantas Bt sobre esses organismos é de suma importância, não só para contribuir com práticas de manejo da cultura mais sustentáveis, como também para prolongar o uso da tecnologia, retardando o mecanismo da resistência. Logo, neste trabalho buscou-se verificar o efeito de três híbridos de milho Bt sobre as relações tróficas em campo

e em laboratório sobre a sobrevivência, desenvolvimento e reprodução de *S. frugiperda*, do parasitoide *C. sonorensis*, e do predador *E. annulipes*.

Capítulo 1: Relações tri-tróficas envolvendo lepidópteros pragas, parasitoides e predadores em milho transgênico

Resumo

Nosso objetivo foi verificar os efeitos de três híbridos de milho Bt (YieldGard -proteína Cry1Ab, YieldGard VTPRO -proteínas Cry1A.105 + Cry2Ab2 e Viptera -proteína Vip3Aa20) sobre as lagartas e inimigos naturais em comparação ao híbrido não transgênico BM207, durante a segunda safra de milho de 2016 e 2017, em Nortelândia-MT. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições para cada tratamento. O levantamento de lagartas e inimigos naturais foi realizado por meio de inspeção visual de 20 plantas por parcela, duas vezes por semana, durante todo ciclo da cultura. A população de *Spodoptera frugiperda* presente na região de Mato Grosso é tolerante aos híbridos YieldGard e YieldGard VTPRO, mas é suscetível ao híbrido Viptera. Contudo, houve a ocorrência de três espécies de *Leucania* e três espécies de *Elaphria* (Lepidoptera: Noctuidae) no híbrido Viptera, sendo esta a primeira citação desses gêneros em milho Bt no Brasil. As populações de parasitoides e tesourinhas predadoras foram afetadas negativamente pelos híbridos YieldGard VTPRO e Viptera em relação ao híbrido YieldGard e não-transgênico. Os principais parasitoides himenópteros de *S. frugiperda* foram *Eiphosoma laphygmae* (Ichneumonidae) e *Dolichozele* sp. (Braconidae) e em relação aos dípteros, *Archytas incertus* (Tachinidae) foi a mais abundante. Lagartas de *Leucania* estavam parasitadas por seis espécies de Braconidae e duas espécies de Tachinidae. Conclui-se que o híbrido Viptera controlou *S. frugiperda*, no entanto afetou de forma negativa os níveis tróficos superiores (predadores e parasitoides) e a comunidade de lepidópteros, com a ocorrência de *Leucania* e *Elaphria*, dentro do agroecossistema.

Palavras-chave: Cry, VIP, predador, parasitoide, lepidóptero.

**Tri-trophic relationships involving lepidopteran pests, parasitoids and predators in transgenic
maize**

Abstract

Our objective was to investigate the effects of three of Bt maize hybrids (YieldGard-Cry1Ab protein, YieldGard VTPRO -proteins Cry1A.105 + Cry2Ab2, Vip3Aa20 protein) on lepidopterous larvae and natural enemies compared to the non-transgenic hybrid BM207, during the maize second crop of 2016 and 2017, in Nortelândia-MT, Brazil. A completely randomized design with four replicates was used for each treatment. The survey of caterpillars and natural enemies was carried out by visual inspection of 20 plants per plot twice a week, throughout the crop cycle. The Mato Grosso population of *Spodoptera frugiperda* is tolerant to YieldGard and YieldGard VTPRO hybrids but is susceptible to Vip3Aa20 Bt hybrid. However, three species of *Leucania* and three species of *Elaphria* (Lepidoptera: Noctuidae) were collected in the hybrid Vip3Aa20, being the first citation of these genera in Bt maize in Brazil. Predator and parasitoid populations were negatively affected by the YieldGard VTPRO and Vip3Aa20 hybrids in relation to the YieldGard and non-transgenic cultivars. The main hymenopteran parasitoids of *S. frugiperda* were *Eiphosoma laphygmae* (Ichneumonidae) and *Dolichozele* sp. (Braconidae) and the most abundant Diptera was *Archytas incertus* Tachinidae). *Leucania* caterpillars were parasitized by six species of Braconidae and two species of Tachinidae. No parasitism was detected on *Elaphria* larvae. It is concluded that the Vip3Aa20 hybrid provides a high level of control of *S. frugiperda*, however it negatively affected the upper trophic levels (predators and parasitoids), as well as being susceptible to the attack by different species of *Leucania* and *Elaphria*.

Key-words: Cry, VIP, predator, parasitoid, lepidopterous.

1. Introdução

A cultura do milho é atacada por diversos insetos, alguns são considerados de importância econômica. As principais pragas pertencem à ordem Lepidoptera, especialmente a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e a lagarta-da-espiga, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). Dentre as pragas secundárias, destacam-se a

lagarta-elasma, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), a broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) e o curuquerê-dos-capinzais, *Mocis latipes* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae) (Gassen, 1994; Cruz e Bianco, 2001).

Com a introdução de plantas geneticamente modificadas resistente a insetos, expressando proteínas de *Bacillus thuringiensis*, surgiu uma nova perspectiva para o manejo de pragas (De Maagd 2015). A partir da liberação da batata-Bt (NewLeaf™) em 1995 (De Maagd et al. 1999), diversas culturas, como beterraba, milho, soja, algodão, arroz, feijão, foram desenvolvidas expressando diferentes conjuntos de proteínas de *B. thuringiensis*, para controlar as pragas alvo de cada cultura (Rabinovitch et al. 2017; Bravo et al. 2017).

O uso de plantas Bt no agroecossistema trouxe benefícios aos insetos não-alvo. Dentre os benefícios destacam-se a redução do uso de inseticidas para o controle das pragas-alvo, mantendo os agroecossistemas saudáveis e funcionais (Poppy e Sutherland, 2004; Tilman et al., 2001; Catarino et al. 2015). Contribuindo para a manutenção dos inimigos naturais nos agroecossistemas (Betz et al., 2000). Contudo, segundo Glare e O'Callaghan (2000), deve-se dar atenção aos efeitos subletais na biologia e comportamento dos inimigos naturais que consomem artrópodes que se alimentam de plantas Bt, uma vez que os resultados sobre seus efeitos a predadores e parasitoides são conflitantes (Pilcher et al. 1997; Al-Deeb et al. 2001; Zwahlen et al. 2003; Bortoli et al. 2017).

No Brasil, o cultivo consecutivo do milho em duas safras (primeira e segunda) favorece o desenvolvimento de múltiplas e sobrepostas de gerações de *S. frugiperda* (Omoto et al. 2016). Esse fator contribui para a exposição dessa praga a uma maior pressão de seleção pelas plantas Bt (Farias et al. 2014a; Bernardi et al. 2015a; Omoto et al. 2016), acarretando na seleção de indivíduos resistentes, capazes de passar essa característica aos seus descendentes, aumentando o número de indivíduos resistentes na população ao longo do tempo (Martinelli et al. 2017). Há registro de populações resistentes de *S. frugiperda* à proteína Bt Cry1F em Porto Rico e no Brasil (Storer et al. 2010; Farias et al. 2014a).

Além disso, existem insetos que são naturalmente tolerantes às toxinas expressas nas plantas Bt, e podem tornar-se pragas primárias e causarem danos significativos à cultura (Sharma e Ortiz, 2000; Catarino et al. 2015). Dentre os fatores que podem desencadear um surto de pragas secundárias, destaca-se: a diminuição de espécies que competem pelo mesmo nicho ecológico, redução de populações de inimigos naturais e redução de aplicações de inseticidas de amplo espectro (Catarino et al. 2015).

Dessa forma, nosso objetivo foi verificar os efeitos de três híbridos de milho Bt sobre a composição da fauna de lagartas e inimigos naturais, em comparação ao híbrido não transgênico durante segunda safra de milho de 2016 e 2017.

2. Material e Métodos

2.1. Experimentos de campo

Os levantamentos foram realizados no Município de Nortelândia (MT) (56°49'44.741"W e 14°9'6.923"S) na segunda safra de 2016 e 2017. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento. Cada repetição foi representada por uma parcela de 20 linhas com 20 m de comprimento e espaçamento de 0,50 m entre linhas. O experimento constou dos híbridos de milho transgênico 30K75Y YieldGard (proteína Cry1Ab), BM780Pro YieldGard VTPRO (proteína Cry1A.105 + Cry2Ab2), Vip3Aa20 e um híbrido não transgênico BM207 (controle). Não foi realizado nenhum tipo de controle de insetos nas parcelas durante o desenvolvimento da cultura. O levantamento de lagartas e inimigos naturais foi realizado por meio de inspeção visual de 20 plantas por parcela, duas vezes por semana, durante todo ciclo da cultura.

2.2. Coleta de lagartas e inimigos naturais

As lagartas coletadas foram levadas ao laboratório, individualizadas em potes plásticos (100 ml) contendo dieta artificial (Greene et al. 1982), até a emergência dos adultos ou dos parasitoides. Os predadores da ordem Dermaptera coletados foram individualizados em potes plásticos de 100ml, contendo papel absorvente umedecido com água e dieta artificial (Lemos 1997). Os adultos obtidos foram enviados a especialistas para identificação. Todos os insetos coletados foram mantidos em sala climatizada à $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 14:10 h e umidade relativa de $70\% \pm 10\%$.

2.3. Análise estatística

Os híbridos transgênicos foram comparados ao híbrido não-transgênico para os parâmetros: quantidade de lagartas, parasitoides e predadores em cada safra, por meio de análise de variância e do teste de Scott-Knott a 5% no Sistema Estatístico R.

3. Resultados

3.1. Lagartas

Spodoptera frugiperda foi a espécie predominante (97%) nos dois anos, e sua abundância não diferiu no híbrido YieldGard (expressando Cry1Ab) em relação ao híbrido não-transgênico (Tabela 01 e Figura 01). No entanto, o híbrido transgênico YieldGard VTPRO, expressando Cry1A.105+ Cry2Ab2, apresentou número significativamente menor de lagartas, mas não impediu a ocorrência de *S. frugiperda*. Já o híbrido Viptera (expressando Vip3Aa20), foi resistente ao ataque da lagarta-do-cartucho nas duas safras avaliadas (Figura 01).

Tabela 1. Número total de lagartas coletadas nos híbridos de milho em Nortelândia, Mato Grosso-Brasil.

Espécies	Safras/ Tratamentos								Total
	2016				2017				
	Controle	YieldGard	YieldGard VTPRO	Viptera	Controle	YieldGard	YieldGard VTPRO	Viptera	
<i>Spodoptera frugiperda</i>	1160	1130	671	20	755	690	181	1	4608
<i>Leucania</i> spp.	4	1	0	19	0	0	0	0	24
<i>Leucania senensis</i>	8	2	0	34	0	0	0	0	44
<i>Leucania rawlinsi</i>	1	0	0	7	0	0	0	0	8
<i>Leucania</i> (total)	13	3	0	60	0	0	0	0	-
<i>Helicoverpa</i> spp.	1	0	0	0	5	5	5	0	16
<i>Elaphria agrotina</i>	0	0	0	0	1	2	0	2	5
<i>Elaphria nucicolora</i>	0	0	0	0	1	0	1	4	6
<i>Elaphria devara</i>	0	0	0	0	1	0	0	4	5
<i>Elaphria</i> (total)	0	0	0	0	3	2	1	10	16
Outras espécies de lagartas	8	2	1	0	7	5	0	0	23
Total	1182	1135	672	80	770	702	187	11	4739

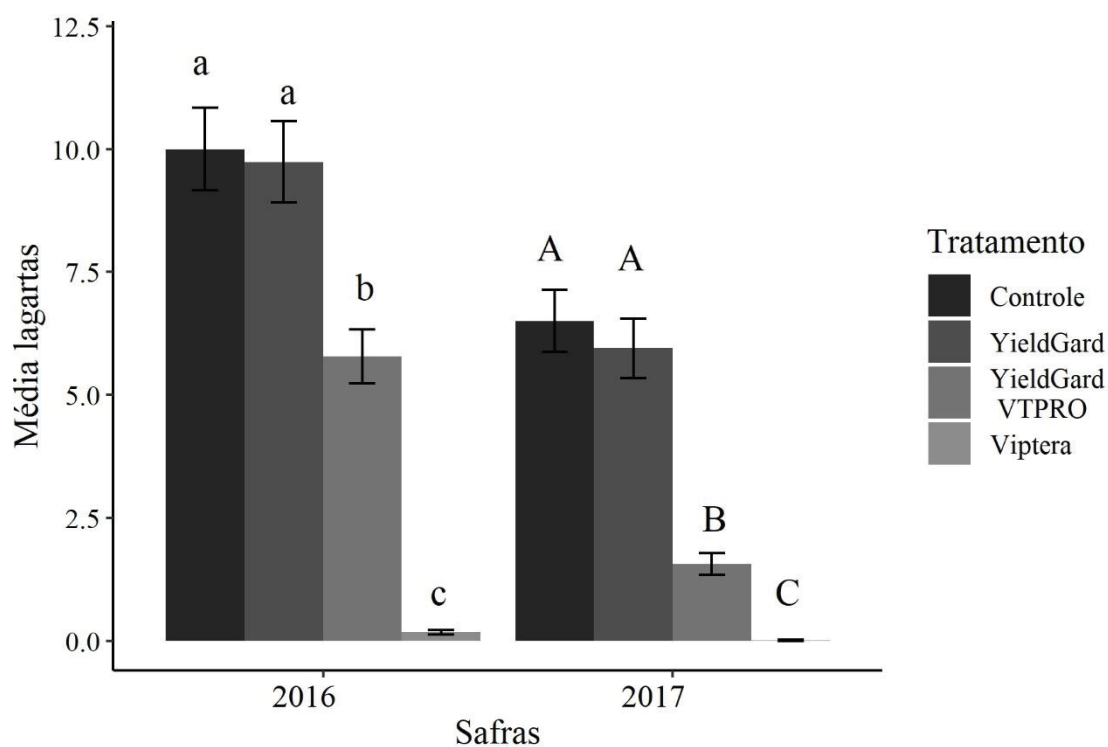


Figura 1. Média de lagartas de *Spodoptera frugiperda* por coleta (barra \pm erro padrão) em Nortelândia-MT, na segunda safra de milho em 2016 e 2017. (Letras minúsculas comparações entre

os tratamentos em 2016 e as letras maiúsculas comparações entre os tratamentos em 2017, segundo análise de ScottKnott 0,05% de probabilidade).

A ocorrência de *Helicoverpa zea* não foi significativa na área experimental, tanto no híbrido convencional quanto no híbrido transgênico, nas duas safras (Tabela 01). No entanto foram coletadas outras espécies de lepidópteros que apresentaram níveis expressivos de ocorrência; em 2016 foram coletadas três espécies de *Leucania*, as quais em conjunto, foram três vezes mais abundantes que *S. frugiperda* no híbrido Viptera. (Tabela 01 e Figura 02). Em 2017 não foram coletadas lagartas de *Leucania spp.*, porém três espécies de *Elaphria* foram mais representativas no híbrido Viptera em relação a *S. frugiperda*, porém não houve diferença estatística entre os híbridos Bt e o híbrido não-transgênico (Tabela 01 e Figura 02).

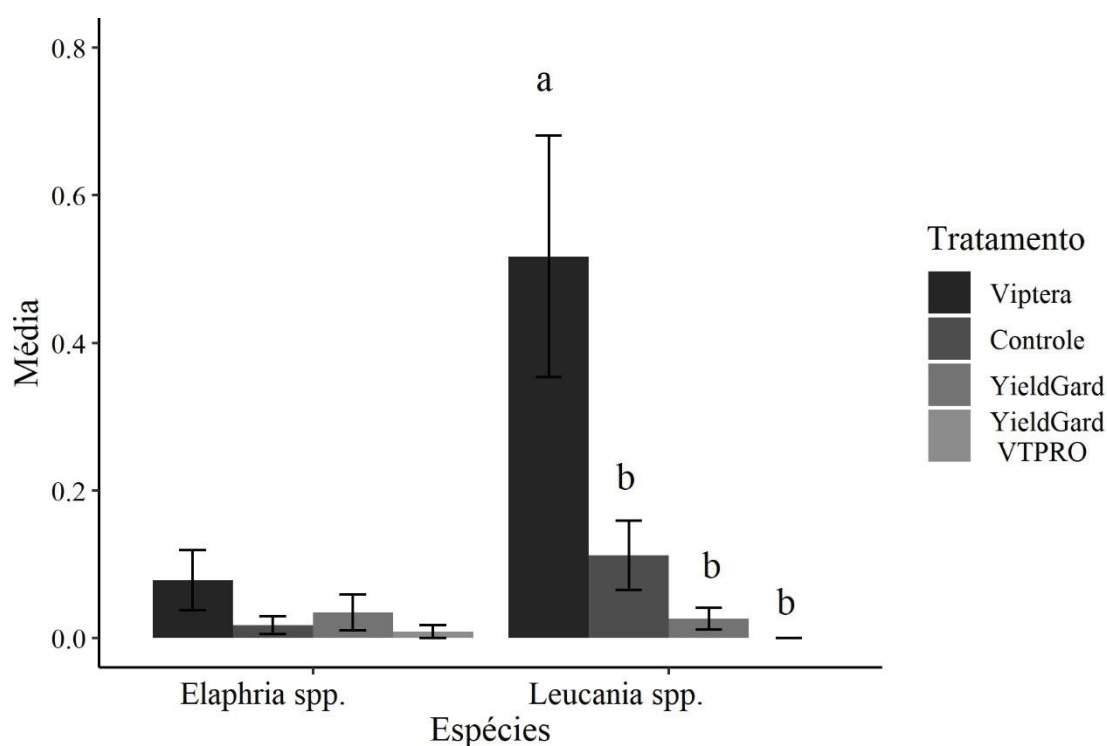


Figura 2. Média de *Elaphria spp.* e *Leucania spp.* por coleta (barra \pm erro padrão) em Nortelândia-MT, na segunda safra de milho em 2016 e 2017. (Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre os híbridos para *Leucania spp.*, e para *Elaphria spp.* não houve significância, ScottKnott 0,05% de probabilidade).

Em 2016 foram coletadas 24 posturas de *S. frugiperda* sendo 10 no híbrido controle, 10 no YieldGard VTPRO, três no híbrido Viptera e uma no híbrido YieldGard, já em 2017 foram coletadas apenas quatro posturas no híbrido YieldGard e uma no híbrido não-transgênico. Não foi registrada a emergência de parasitoides dessas posturas.

3.2. Parasitoides larvais

Das lagartas de *S. frugiperda* coletadas, emergiram 12 espécies de parasitoides, sendo oito espécies de Hymenoptera e quatro espécies de Diptera, nas duas safras (Tabela 02). Os parasitoides de *S. frugiperda* mais abundantes, dentre os himenópteros foram, *Eiphosoma laphygmae* (Ichneumonidae) e *Dolichozele* sp. (Braconidae) e, em relação aos tachinídeos, foi *Archytas incertus*.

Não houve diferença estatística entre a quantidade de parasitoides do híbrido não-transgênico e no YieldGard (Tabela 02), nas duas safras. A menor quantidade de lagartas de *S. frugiperda* parasitadas ocorreu nos híbridos YieldGard VTPRO nos dois anos de pesquisa (Figura 03). No híbrido Viptera a ocorrência de lagarta-do-cartucho foi baixa e não houve incidência de parasitoides larvais. No entanto, neste híbrido, foram coletadas em 2016 seis espécies de parasitoides da Família Braconidae e duas de Tachinidae em duas espécies de *Leucania*, resultando em 64,7% de lagartas parasitadas no híbrido Viptera. Nas lagartas de *Elaphria* coletadas, não se registou emergência de parasitoides.

Tabela 2. Número total de parasitoides coletados em lagartas de *Spodoptera frugiperda* e *Leucania* spp. nos híbridos de milho em Nortelândia, Mato Grosso-Brasil.

Parasitoides	Safras/ Tratamentos								Total
	2016				2017				
	Controle	YieldGard	YieldGard VTPRO	Viptera	Controle	YieldGard	YieldGard VTPRO	Viptera	
<i>Spodoptera frugiperda</i>									
Hymenoptera									
<i>Cotesia</i> sp.	5	6	5	0	3	2	2	0	23
<i>Eiphosoma laphygmae</i>	25	21	22	1	1	13	0	0	83
<i>Chelonus</i> sp.	2	11	5	0	0	3	0	0	21
<i>Houghia</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Exasticolus</i> sp.	10	12	9	0	2	4	0	0	37
<i>Dolichozele</i> sp.	7	5	8	1	13	10	5	0	49
<i>Campoletis sonorensis</i>	0	0	0	0	10	4	0	0	14
<i>Ophion flavidus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Diptera									
<i>Archytas incertus</i>	9	19	2	0	6	6	0	0	42
<i>Winthenia</i>	1	3	1	0	2	2	1	0	10
<i>Archytas marmoratus</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Houghia</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Leucania</i> spp.									
Hymenoptera									
<i>Exasticolus</i> sp.	0	0	0	3	0	0	0	0	3
<i>Dolicozeles</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Diolcogaster</i> sp.	2	0	0	1	0	0	0	0	3
<i>Glyptapanteles</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Aleiodes conformis</i>	3	0	0	3	0	0	0	0	6
<i>Coccygidium</i> sp.	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Diptera									
<i>Archytas cirphis</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Eucelatoria</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	69	77	52	13	37	44	8	0	300
Scott-Knott	0,6±0,1 a	0,7±0,1 a	0,5±0,1 a	0,2±0,06 b	0,4±0,06 A	0,4±0,1 A	0,1±0,02 B	0±0 B	-

(Média de parasitoide por coleta ± erro padrão. Média seguidas pela mesma letra dentro de cada safra não diferem estatisticamente segundo teste de ScottKnott a 5%).

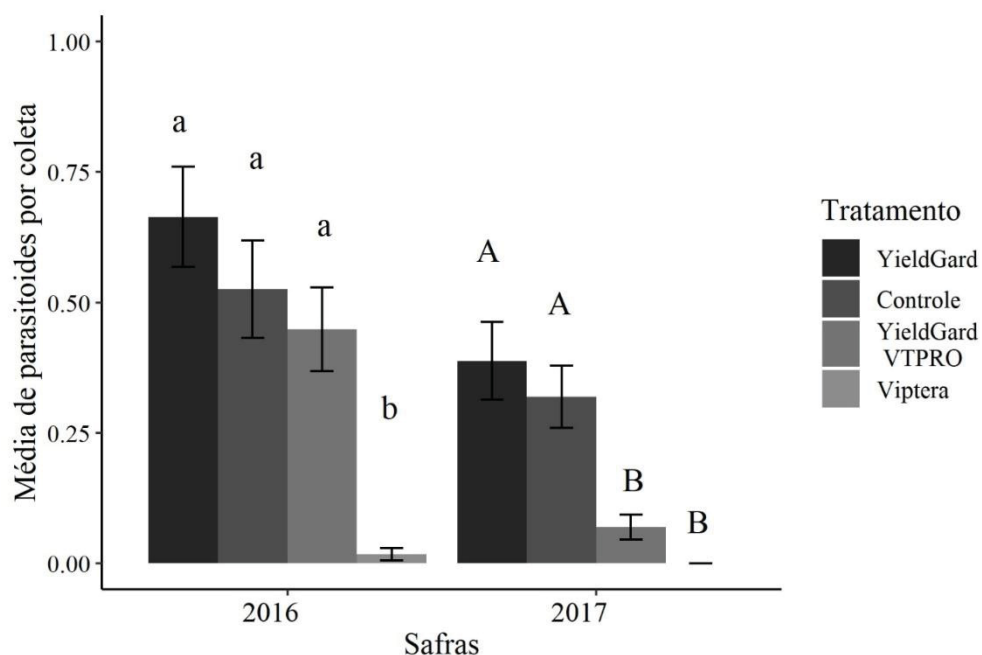


Figura 3. Média de lagartas de *Spodoptera frugiperda* parasitadas em cada coleta (barra \pm erro padrão), na segunda safra de milho de 2016 e 2017 em Nortelândia-MT. (Letras minúsculas comparações entre os tratamentos em 2016 e as letras maiúsculas comparações entre os tratamentos em 2017, segundo análise de ScottKnott 0,05% de probabilidade).

3.3. Predadores

Foram coletadas duas espécies de dermápteros; *Doru* sp. e *Euborellia annulipes*, sendo que 93% dos predadores coletados pertenciam à segunda (Tabela 03) e sua presença foi maior em 2016 em relação a 2017. *Euborellia annulipes* foi afetada negativamente pelos híbridos Viptera YieldGard VTPRO em comparação ao híbrido Bt YieldGard e o híbrido não-transgênico (Figura 04).

Tabela 3. Número de predadores dermápteros coletados nos híbridos em Nortelândia, Mato Grosso-Brasil. (Média de tesourinha por coleta \pm erro padrão. Média seguidas pela mesma letra dentro de cada safra não diferem estatisticamente segundo teste de ScottKnott a 5%).

Safra	Espécies	<i>Doru</i> sp.	<i>Euborellia annulipes</i>	Total
2016	Controle	0	94	94 (0,81 \pm 0,14 a)
	YieldGard	5	92	97 (0,84 \pm 0,14 a)
	YieldGard VTPRO	0	40	40 (0,34 \pm 0,07 b)
	Viptera	0	16	16 (0,14 \pm 0,05 b)
	Total	13	305	318
2017	Controle	3	28	31 (0,26 \pm 0,07 A)
	YieldGard	4	20	24 (0,21 \pm 0,05 A)
	YieldGard VTPRO	0	4	4 (0,03 \pm 0,02 B)
	Viptera	1	11	12 (0,10 \pm 0,06 B)
	Total	13	305	318

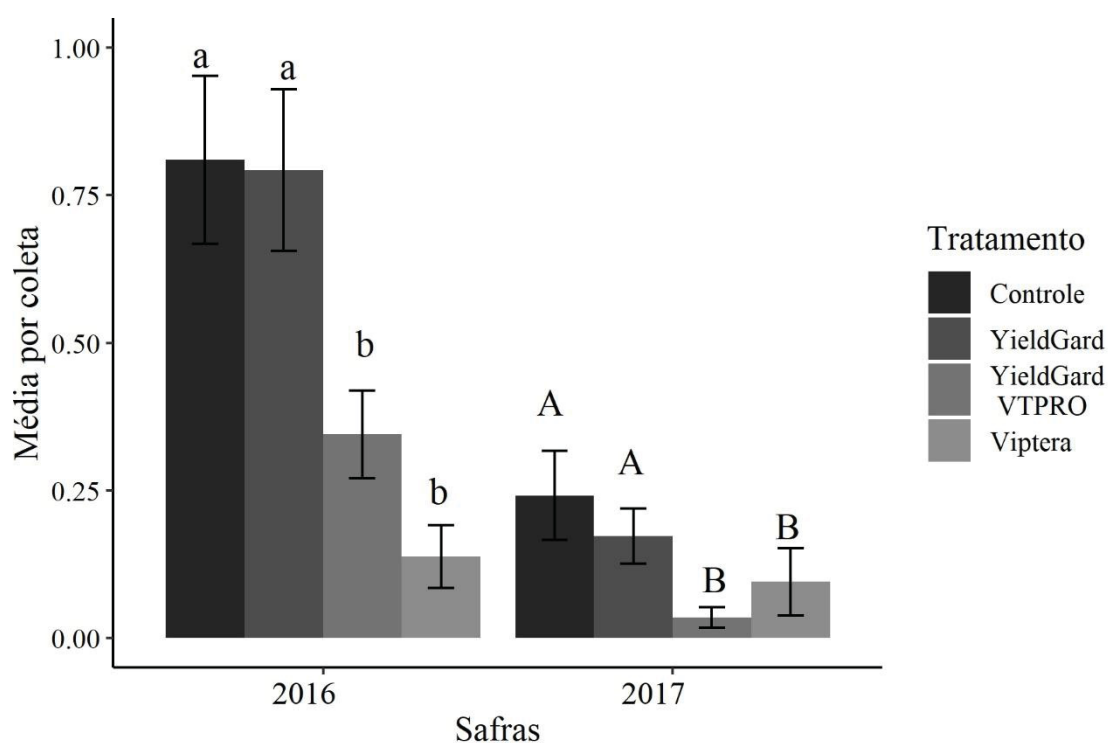


Figura 4. Ocorrência do predador *Euborellia annulipes*, em híbrido de milho Bt e não-Bt na segunda safra de 2016 e 2017 em Nortelândia, Mato Grosso-Brasil. (Média seguidas pela mesma letra dentro de cada safra não diferem estatisticamente segundo teste de ScottKnott a 5%).

4. Discussão

Os híbridos YieldGard e YieldGard VTPRO, que expressam as proteínas Cry1Ab e Cry1A.105+ Cry2Ab2 respectivamente, não impediram o ataque da lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda*, como anteriormente verificado no Brasil para a proteína Cry1Ab (Omoto et al. 2016) e Cry1A.105+ Cry2Ab2 (Fatoretto et al. 2017; Bernardi et al. 2015a). No país, já existem populações de *S. frugiperda* resistentes ao milho Bt expressando a proteína Cry1F, presente no primeiro híbrido de milho liberado comercialmente (Farias et al. 2014a; 2014b; Burtet et al. 2017). A resistência da lagarta-do-cartucho às plantas Bt emergiu em outros países, como Porto Rico (Storer et al. 2012), Paraguai (Gómez et al. 2017), Argentina (Blanco et al. 2016). Segundo Blanco et al. (2016), *S. frugiperda* é a praga mais importante e o maior problema no milho transgênico e não-transgênico na América Latina, demonstrando a importância de se realizar o monitoramento frequente na cultura.

O híbrido Viptera, que expressa Vip3Aa20, mostrou-se altamente eficiente no controle de *S. frugiperda*, corroborando com os resultados observados por Bergamasco et al. (2012), Bernardi et al. (2014) e Burtet et al. (2017). Contudo Bernardi et al. (2015b) verificaram a presença de alelos resistentes, na população de *S. frugiperda* da Bahia em relação às populações de Goiás, Mato Grosso Minas Gerais e Paraná, mas a frequência dos alelos da resistência é baixa, o que não reflete no risco imediato de resistência. Porém é importante realizar práticas no manejo de pragas em culturas transgênicas, como proposto por Romeis et al. (2006) e Campbell et al. (2018), para retardar a evolução de populações resistentes.

Dentre as demais espécies de noctuídeos, foram coletadas três espécies de *Leucania* e três de *Elaphria*, ambas no híbrido Viptera. Este é o primeiro registro da ocorrência desses gêneros em milho Bt no Brasil, em especial no híbrido Viptera, o qual é tolerante ao ataque de *S. frugiperda*. *Elaphria* e *Leucania* apresentam ampla distribuição pela América, e fazem parte de um conjunto de gêneros de noctuídeos conhecidos por usarem monocotiledôneas como plantas hospedeiras (Swezey 1947; Adams 2001). Podem estar associadas a Poaceae de interesse econômico, como milho, arroz, sorgo,

cana-de-açúcar e trigo (Habeck et al. 1965; Heppner 2003; Janzen & Hallwachs 2009; Wagner et al. 2011; Specht et al. 2014). No entanto, esses gêneros não são considerados pragas principais dessas culturas.

A ocorrência de espécies não-alvo como *Leucania* e *Elaphria*, pode ser favorecida pela ausência de *S. frugiperda*, visto que encontram um agroecossistema com competição reduzida e abundante disponibilidade de alimento, favorecendo o aumento populacional, que ao longo do tempo pode acarretar prejuízos econômicos para a cultura (Wolfenbarger e Phifer 2000; Bernal et al. 2004; Catarino et al. 2015). Outros fatores podem favorecer o aumento populacional de insetos não-alvo devido à redução no uso de inseticidas de amplo espectro e de inimigos naturais nas áreas com plantas Bt (Catarino et al. 2015). Lu et al. (2010) na China, relatam o aumento de mirídeos devido ao aumento da área de algodão Bt e redução na aplicação de inseticidas para o controle de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), aplicações estas que contribuíam para o controle do percevejo sugador.

Nos híbridos Viptera e YieldGard VTPRO houve menor presença de parasitoides em relação ao híbrido transgênico YieldGard e o híbrido não-transgênico, devido à menor disponibilidade de hospedeiros nesses híbridos Bt. A ausência do hospedeiro no campo é o primeiro efeito negativo causado por plantas Bt refletindo na sobrevivência e diversidade dos inimigos naturais em campo (Groot e Dicke 2002; Jacobsen et al. 2013). Resultados de Schuler et al. (2001), em simuladores de campo, mostraram que colza (*Brassica napus*, L.) transgênica Bt (expressando Cry1Ac) não afetou as interações entre *Myzus persicae* (Sulzer) e seu parasitoide *Diaeretiella rapae* (McIntosh). Bourguet et al. (2002) encontraram níveis mais baixos de parasitismo em *Ostrinia nubilalis* (Hübner) por parasitoides taquinídeos (*Lydella thompsoni* (Herting) e *Pseudoperichaeta nigrolineata* (Walker)) em milho Bt (Cry1Ab) comparado com milho não-Bt. No entanto Orr e Landis (1997) não observaram efeitos negativos de milho Bt (Cry1Ab) no parasitismo de larvas de *Ostrinia nubilalis* (Hübner) por *Eriborus terebrans* (Gravenhorst) e *Macrocentrus grandii* (Goidanich).

De acordo com Chen et al. (2008) os predadores geralmente se alimentam de diferentes espécies de artrópodes durante sua vida, e assim podem escolher presas nutricionalmente melhores ou buscar outras fontes de alimento, quando as presas forem escassas. Portanto o risco dos predadores serem afetados pelas plantas Bt é menor em comparação aos parasitoides, que se desenvolvem em um único hospedeiro (Han et al. 2016). Nesse sentido os predadores *E. annulipes* não foram afetados pelos híbridos YieldGard e YieldGard VTPRO, devido à disponibilidade de *S. frugiperda* nesses híbridos no campo, mas foram afetados pela falta de presas no híbrido Viptera. Frizzas et al. (2014) e Silva et al (2018) também não observaram efeitos negativos do milho Bt expressando a proteína Cry1Ab sobre *Doru luteipes* (Scudder) (Dermaptera: Forficulidae) no Brasil. Zhou et al. (2016), não observaram diferença na sazonalidade do predador *Micraspis discolor* (Fabricius) em arroz expressando Cry1Ab + Cry1Ac e o arroz não Bt.

Embora efeitos negativos das plantas Bt sobre os inimigos naturais sejam constatados em áreas Bt, ainda assim estas apresentam melhores condições para sobrevivência e manutenção dos inimigos naturais em relação às áreas agrícolas com aplicação de inseticidas (Naranjo 2005; Romeis et al. 2006; Wolfenbarger et al. 2008).

Além disso, os riscos da evolução de insetos resistentes e a ocorrência de surtos de pragas secundárias tornam-se menos prováveis, quando as plantas Bt são utilizadas dentro do contexto de Manejo Integrado de Pragas (Romeis et al. 2006; Kos et al. 2009; Catarino et al. 2015; Capalbo et al. 2017) evidenciando que o monitoramento é a principal forma para detectar esses riscos, antes que se tornem irreversíveis.

5. Referências Bibliográficas

Adams, M. S. (2001) A revision of the moth genus *Leucania* Ochsenheimer in the Antilles (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). Annals of Carnegie Museum 70 (1), 179–220.

- Al-Deeb, M. A., Wilde, G. E., & Higgins, R. A. (2001). No effect of *Bacillus thuringiensis* corn and *Bacillus thuringiensis* on the predator *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae). *Environmental Entomology*, 30(3), 625-629.
- Bergamasco, V. B., Mendes, D. R. , Fernandes, O. A., Desidério J. Á., & Lemos, M.V. (2012). Interações das proteínas Cry1Ia10 e Vip3Aa de *Bacillus thuringiensis* e toxicidade para larvas de *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 49(2):79-87.
- Bernal, J. S., Prasifka, J. R., Sétamou, M., & Heinz, K. M. (2004). Transgenic insecticidal cultivars in integrated pest management: challenges and opportunities. *Integrated Pest Management: Potential, Constraints and Challenges*. CAB International, Oxfordshire, UK, pp. 123-145.
- Bernardi, O., Amado, D., Sousa, R. S., Segatti, F., Fatoretto, J., Burd, A. D., & Omoto, C. (2014). Baseline susceptibility and monitoring of Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to Vip3Aa20 insecticidal protein. *Journal of Economic Entomology*, 107(2), 781-790.
- Bernardi, D., Salmeron, E., Horikoshi, R. J., Bernardi, O., Dourado, P. M., Carvalho, R. A., ... & Omoto, C. (2015a). Cross-resistance between Cry1 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current pyramided Bt maize hybrids in Brazil. *PLoS One*, 10(10), e0140130.
- Bernardi, O., Bernardi, D., Ribeiro, R. S., Okuma, D. M., Salmeron, E., Fatoretto, J., ... & Omoto, C. (2015b). Frequency of resistance to Vip3Aa20 toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. *Crop Protection*, 76, 7-14.
- Betz, F. S., Hammond, B. G., & Fuchs, R. L. (2000). Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32(2), 156-173.

- Blanco, C. A., Chiaravalle, W., Dalla-Rizza, M., Farias, J. R., García-Degano, M. F., Gastaminza, G., ... & Rodríguez, J. (2016). Current situation of pests targeted by Bt crops in Latin America. *Current opinion in insect science*, 15(1), 131-138.
- Bortoli, S. A., Vacari, A. M., Polanczyk, R. A., Veiga, A. C. P., & Goulart, R. M. (2017). Effect of *Bacillus thuringiensis* on Parasitoids and Predators. In *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Springer, Cham. pp. 67-77.
- Bourguet, D., Chaufaux, J., Micoud, A., Delos, M., Naibo, B., Bombarde, F., ... & Pagliari, C. (2002). *Ostrinia nubilalis* parasitism and the field abundance of non-target insects in transgenic *Bacillus thuringiensis* corn (*Zea mays*). *Environmental Biosafety Research*, 1(1), 49-60.
- Bravo, A., Pacheco, S., Gómez, I., García-Gómez, B., Onofre, J., & Soberón, M. (2017). Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and their mechanism of action. In *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Springer, Cham. pp. 53-66.
- Burtet, L. M., Bernardi, O., Melo, A. A., Pes, M. P., Strahl, T. T., & Guedes, J. V. (2017). Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil. *Pest Management Science*, 73(12), 2569-2577.
- Campbell, J., Veizaj, J., Evans, N., Taylor, S., & Emani, C. (2018). Transgenic approaches to combatting insect pests in the field. In *The Biology of Plant-Insect Interactions*. CRC Press. pp. 113-128.
- Capalbo, D. M. F., & Suzuki, M. T. (2017). The Importance of *Bacillus thuringiensis* in the Context of Genetically Modified Plants in Brazil. In *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Springer, Cham. pp. 259-271.
- Catarino, R., Ceddia, G., Areal, F. J., & Park, J. (2015). The impact of secondary pests on *Bacillus thuringiensis* (Bt) crops. *Plant biotechnology journal*, 13(5), 601-612.
- Catarino, R., Ceddia, G., Areal, F., Parisey, N., & Park, J. (2016). Managing maize under pest species competition: Is Bt (*Bacillus thuringiensis*) maize the solution?. *Ecosphere*, 7(6), e01340.

- Chen, M., Zhao, J. Z., Collins, H. L., Earle, E. D., Cao, J., & Shelton, A. M. (2008). A critical assessment of the effects of Bt transgenic plants on parasitoids. *PLoS One*, 3(5), e2284.
- Cruz, I., & Bianco, R. (2001). Manejo de pragas na cultura de milho safrinha. In Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso. In: Seminário Nacional de Milho Safrinha, Londrina. Valorização da produção e conservação de grãos no Mercosul: resumos e palestras. Londrina: FAPEAGRO: IAPAR, 2001. p. 79-112.
- De Maagd, R. A. (2015). *Bacillus thuringiensis*-based products for insect pest control. In *Principles of Plant-microbe Interactions*. Springer, Cham., pp. 185-192.
- De Maagd, R. A., Bosch, D., & Stiekema, W. (1999). *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends in Plant Science*, 4(1), 9–13.
- Farias, J. R., Andow, D. A., Horikoshi, R. J., Sorgatto, R. J., Fresia, P., dos Santos, A. C., & Omoto, C. (2014a). Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop protection*, 64, 150-158.
- Farias, J. R., Horikoshi, R. J., Santos, A. C., & Omoto, C. (2014b). Geographical and temporal variability in susceptibility to Cry1F toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. *Journal of economic entomology*, 107(6), 2182-2189.
- Fatoretto, J. C., Michel, A. P., Silva Filho, M. C., & Silva, N. (2017). Adaptive potential of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) limits Bt trait durability in Brazil. *Journal of Integrated Pest Management*, 8(1), 1- 17.
- Frizzas, M. R., Silveira Neto, S., Oliveira, C. M. D., & Omoto, C. (2014). Genetically modified corn on fall armyworm and earwig populations under field conditions. *Ciência Rural*, 44(2), 203-209.
- Gassen, D. N. (1994). Pragas associadas à cultura do milho. Aldeia Norte, p. 90.
- Glare TR, O'Callaghan M (2000) *Bacillus thuringiensis* biology, ecology and safety. Wiley, Chichester, 350p.

- Gómez, V. A., Villalba, G. E., Arias, O. R., Ramírez, M. B., & Gaona, E. F. (2017). Toxicidad sobre *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) de la proteína Bt expresada en hojas de diferentes eventos de maíz transgénico liberados en Paraguay. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 76(1-2), 0-0.
- Green, R. F., Gordh G. & Hawkins A. B., (1982). Precise sex ratios in highly inbred parasitic wasps. *The American Naturalist*, 120(5), 653-665.
- Groot, A. T., & Dicke, M. (2002). Insect-resistant transgenic plants in a multi-trophic context. *The Plant Journal*, 31(4), 387-406.
- Habeck, D. H. (1965). Laboratory culture and development in *Elaphria nucicolora* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*, 48(1), 187-188.
- Han, P., Velasco-Hernández, M. C., Ramirez-Romero, R., & Desneux, N. (2016). Behavioral effects of insect-resistant genetically modified crops on phytophagous and beneficial arthropods: a review. *Journal of pest science*, 89(4), 859-883.
- Heppner J (2003) Lepidoptera of Florida. Part 1: Introduction and catalog. In: *Arthropods of Florida and neighboring land areas*. Gainesville: Florida Department of Agriculture & Consumer Services, 670 pp.
- Jacobsen, S. E., Sørensen, M., Pedersen, S. M., & Weiner, J. (2013). Feeding the world: genetically modified crops versus agricultural biodiversity. *Agronomy for sustainable development*, 33(4), 651-662.
- Janzen, D. H. & Hallwachs, W. (2009) Dynamic database for an inventory of the macrocaterpillar fauna, and its food plants and parasitoids, of Area de Conservacion Guanacaste (ACG), northwestern Costa Rica. <http://janzen.sas.upenn.edu>. Ultimo acceso: 17, novembro, 2018.
- Kos, M., van Loon, J. J., Dicke, M., & Vet, L. E. (2009). Transgenic plants as vital components of integrated pest management. *Trends in biotechnology*, 27(11), 621-627.
- Lemos, W. (1997). Biologia e exigências térmicas de *Euborellia annulipes* (Lucas, 1847) (Dermaptera: Anisolabididae), predador do bicudo-do-algodoeiro. 1997, 132 p. Monografia

(Trabalho de Graduação em Agronomia)–Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB: UFPB/CCA.

- Lu, Y., Wu, K., Jiang, Y., Xia, B., Li, P., Feng, H., Wyckhuys, K. A. G. & Guo, Y. (2010). Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China. *Science*, 328, 1151-1154.
- Martinelli, S., de Carvalho, R. A., Dourado, P. M., & Head, G. P. (2017). Resistance of *Spodoptera frugiperda* to *Bacillus thuringiensis* Proteins in the Western Hemisphere. In *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Springer, Cham pp. 273-288.
- Moar, W. J., & Anilkumar, K. J. (2007). The power of the pyramid. *Science*, 318(5856), 1561-1562.
- Naranjo, S. E. (2005). Long-term assessment of the effects of transgenic Bt cotton on the abundance of nontarget arthropod natural enemies. *Environmental Entomology*, 34(5), 1193-1210.
- Omoto, C., Bernardi, O., Salmeron, E., Sorgatto, R. J., Dourado, P. M., Crivellari, A., ... & Head, G. P. (2016). Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Management Science*, 72(9), 1727-1736.
- Orr, D. B., & Landis, D. A. (1997). Oviposition of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and impact of natural enemy populations in transgenic versus isogenic corn. *Journal of Economic Entomology*, 90(4), 905-909.
- Pilcher, C. D., Obrycki, J. J., Rice, M. E., & Lewis, L. C. (1997). Preimaginal development, survival, and field abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis* corn. *Environmental Entomology*, 26(2), 446-454.
- Poppy, G.M. and Sutherland, J.P. (2004) Can biological control benefit from genetically-modified crops? Tritrophic interactions on insect-resistant transgenic plants. *Physiol. Entomol.* 29, 257–268.
- Rabinovitch, L., Vivoni, A. M., Machado, V., Knaak, N., Berlitz, D. L., Polanczyk, R. A., & Fiuza, L. M. (2017). *Bacillus thuringiensis* Characterization: Morphology, Physiology,

- Biochemistry, Pathotype, Cellular, and Molecular Aspects. In *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Springer, Cham. pp. 1-18.
- Romeis, J., Meissle, M., & Bigler, F. (2006). Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature biotechnology*, 24(1), 63.
- Schuler, T. H., Denholm, I., Jouanin, L., Clark, S. J., Clark, A. J., & Poppy, G. M. (2001). Population-scale laboratory studies of the effect of transgenic plants on nontarget insects. *Molecular Ecology*, 10(7), 1845-1853.
- Sharma, H. C., & Ortiz, R. (2000). Transgenics, pest management, and the environment. *Current Science*, 421-437.
- Silva, G. A., Picanço, M. C., Ferreira, L. R., Ferreira, D. O., Farias, E. S., Souza, T. C., ... & Pereira, E. J. G. (2018). Yield losses in transgenic Cry1Ab and non-Bt Corn as assessed using a crop-life-table Approach. *Journal of economic entomology*, 111(1), 218-226.
- Specht, A., Soria, M. F., Maba, T. S., Belufi, L. M., Godoi, B., Pereira, M. J. & Paula-Moraes, S. V. (2014). First Report of *Elaphria agrotina* and *Elaphria deltoides* (Lepidoptera: Noctuidae: Elaphriini) Feeding on Maize. *Journal of Economic Entomology*, 107(1), 1458-1461.
- Storer, N. P., Babcock, J. M., Schlenz, M., Meade, T., Thompson, G. D., Bing, J. W., & Huckaba, R. M. (2010). Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of economic entomology*, 103(4), 1031-1038.
- Storer, N. P., Kubiszak, M. E., King, J. E., Thompson, G. D., & Santos, A. C. (2012). Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. *Journal of invertebrate pathology*, 110(3), 294-300.
- Swezey, O. H. (1947). *Elaphria nucicolora* (Guenee), a Recent Immigrant to Hawaii. *Proc. Hawn. Ent. Soc*, 13(1), 1-10.

- Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D'Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., Schindler, D., Schlesinger, W.H., Simberloff, D. and Swackhamer, D. (2001) Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science*, 292(1), 281–284.
- Wagner, D. L., Schweitzer, D. F., Sullivan, J. B. & Reardon, R. C. (2011) *Owlet caterpillars of Eastern North America*. Princeton University Press, Princeton, 576 pp.
- Wolfenbarger, L. L., Naranjo, S. E., Lundgren, J. G., Bitzer, R. J., & Watrud, L. S. (2008). Bt crop effects on functional guilds of non-target arthropods: a meta-analysis. *PLoS One*, 3(5), e2118.
- Wolfenbarger, L.L. and Phifer, P.R. (2000) The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science*, 290(2), 2088–2093.
- Zhou, X., Guo, Y., Kong, H., Zuo, J., Huang, Q., Jia, R., ... & Xu, L. (2016). A comprehensive assessment of the effects of transgenic Cry1Ac/Cry1Ab rice Huahui 1 on adult *Micraspis discolor* (Fabricius)(Coleoptera: Coccinellidae). *PloS one*, 11(2), e0142714.
- Zwahlen, C., Hilbeck, A., Howald, R., & Nentwig, W. (2003). Effects of transgenic Bt corn litter on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Molecular ecology*, 12(4), 1077-1086.

Capítulo 2: Effect of three insect-resistant transgenic maize introductions on the development and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

Abstract

We evaluated in laboratory the efficiency of the commercial transgenic maize hybrids YieldGard (Cry1Ab), YieldGard VTPRO (Cry1A.105+ Cry2Ab2) and Viptera (Vip3Aa20), and a non-transgenic hybrid BM207 (control), for the control of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Larval and pupal development time and survival were evaluated, as well as adult longevity, fecundity and egg viability. The data were submitted to analysis of survival, analysis of generalized linear models and Tukey's test for the variable pupal weight using the software R. The hybrid Vip3Aa20 caused 100% mortality of *S. frugiperda*, before larvae completed the first instar; however, they survived when feeding on the YieldGard hybrid expressing Cry1Ab protein and the pyramidal hybrid (Cry1A.105 + Cry2Ab2). Both these hybrids affected the larval and pupal period and larval and pupal weight. Fecundity was statistically lower in females emerged from larvae reared on the transgenic hybrids in relation to the control, but there was no difference in egg viability among treatments. The ingestion of the transgenic cultivars inflicted costs to the development and reproduction of *S. frugiperda*, indicating the tendency of this population to adapt to this technology.

Key-Words: survival, Bt maize, Vip, Cry, tolerance, fall armyworm

Efeito de três híbridos de milho transgênico resistentes a insetos no desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

Resumo

Avaliou-se a eficiência dos híbridos comerciais de milho transgênico YieldGard (Cry1Ab), YieldGard VTPRO (Cry1A.105 + Cry2Ab2) e Viptera (Vip3Aa20), e um híbrido não transgênico BM207 (controle), em laboratório, para o controle de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Foram avaliados os parâmetros biológicos: o tempo de desenvolvimento e

a sobrevivência das larvas e das pupas, bem como a longevidade, a fecundidade e a viabilidade dos ovos em adultos. Os dados foram submetidos à análise de sobrevivência, análise de modelos lineares generalizados e para a variável peso de pupas foi utilizado teste de Tukey no software R. O híbrido Vip3Aa20 causou 100% de mortalidade de *S. frugiperda*, antes das larvas completarem o primeiro instar. No entanto, eles sobreviveram quando se alimentaram da proteína Cry1Ab de expressa no híbrido YieldGard e no híbrido piramidado (Cry1A.105 + Cry2Ab2). Ambos os híbridos afetaram o período larval e pupal e o peso larval e pupal. A fecundidade foi estatisticamente menor nas fêmeas provenientes dos híbridos transgênicos em relação ao controle, mas não houve diferença na viabilidade dos ovos entre os tratamentos. A ingestão dos cultivares transgênicos acarretou custos para o desenvolvimento e reprodução de *S. frugiperda*, indicando a tendência desta população em se adaptar a essa tecnologia.

Palavras-chave: sobrevivência, milho Bt, Vip, Cry, tolerância, lagarta-do-cartucho

1. Introduction

The fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), is a polyphagous species, feeding on more than 80 plant species such as cotton, maize and soybean (Pogue, 2002; Barros *et al.*, 2010). In Brazil, yield reductions in maize due to the damage caused by the armyworm range from 34% to 52% (Valicente, 2015). To maintain maize production profitable, integrated pest management techniques are required in order to keep *S. frugiperda* below the economic damage level (Valicente, 2015).

The control of *S. frugiperda* is carried out mainly by chemical neurotoxic insecticides and growth regulators (Yu, 2006; Casida, 2009; Silva *et al.*, 2017). However, the increasing and intensive use of insecticides for pest control in agriculture has resulted in several undesirable effects to the environment (Papadakis *et al.*, 2015) and human health (Kesavachandran *et al.*, 2009). In agriculture, the indiscriminate use of chemical insecticides has caused insect resistance (Aktar *et al.*, 2009),

reduction in predator and parasitoid numbers (Roubos *et al.*, 2014) and outbreaks of secondary pests (Casida & Quistad, 1998; Devine & Furlong, 2007; Roubos *et al.*, 2014)

The development of genetically modified plants expressing toxic proteins of *B. thuringiensis* (Bt plants), enabled a new tactic for the management of *S. frugiperda* (Okumura *et al.*, 2013; Waquil *et al.*, 2013; Omoto *et al.*, 2016). In 1996, the first varieties of plants expressing the toxic Cry proteins were commercialized (Shelton *et al.*, 2002). In Brazil, the commercial use of transgenic plants was released in 2008 (Waquil *et al.*, 2013), which resulted in a reduction in insecticide use and an increase in the population of natural enemies. Worldwide, in 2016 transgenic crops occupied 185 million hectares (James, 2016), the United States, Brazil, Argentina, Canada and India as the main countries deploying this technology. Brazil has experienced the highest growth rate in the use of genetically modified plants since its introduction in 2008, reaching 4.9 million hectares planted in 2016 (James, 2016). In Brazil, transgenic maize occupies the second position in cultivated area after soybeans, and the largest part of this area is in the State of Mato Grosso (National Company of Supply, CONAB, 2007).

Extensive use of transgenic plants however has brought precocious undesirable effects (Tabashnik *et al.*, 2003; O'Callaghan, 2005; Catarino *et al.*, 2015) which should be investigated and addressed in order to preserve the benefits provided by this technology.

Andow (2008) discussed the risks of insect resistance to transgenic crops and the urgent need for resistance management strategies to avoid the precocious appearance of insect strains resistant to Bt technology. Farias *et al.* (2014b) reported the survival of larvae and emergence of normal adults of *S. frugiperda* reared on leaves of Cry1F Bt protein, a hybrid previously described as highly toxic to this species. Blanco *et al.* (2016) stated that of 31 pest species (27 Lepidoptera and four Coleoptera) controlled by Bt toxic genes in annual crops in Latin America, only *S. frugiperda* has shown tolerance to cultivars that express only one Bt protein.

We evaluated the effects of three transgenic maize hybrids, two expressing a single Bt protein, YieldGard (Cry1Ab) and Vip3Aa20 and one expressing two Bt proteins, YieldGard

VTPRO (Cry1A.105+ Cry2Ab2) on the biology of *S. frugiperda* to investigate if these cultivars affect its development and reproduction. The results were compared to those obtained from larvae feeding on a non-transgenic maize cultivar (BM207).

2. Material and Methods

2.1. Insect and plant cultures

Field-collected larvae were reared in the laboratory on artificial diet according to the methodology described by Kasten Júnior *et al.* (1978) in a climatized room at 26 ± 2 ° C, $70 \pm 10\%$ relative humidity and photoperiod of 14:10 h (L: D).

The tests were carried out with newly hatched larvae of *S. frugiperda* from the third generation kept in the laboratory. The colony started with larvae collected in the second (autumn) maize crop in 2016 in the municipality of Nortelândia, Mato Grosso ($56^{\circ} 49'44.741$ "W and $14^{\circ} 9'6.923$ " S), Brazil. This population of *S. frugiperda* had been in contact with the protein Cry1A.105 + Cry2Ab2 for two years and previously with the protein Cry1Ab; however, the Vip3Aa20 protein had not been used in the area, so that larvae had not been previously associated with it.

The commercial transgenic varieties 30K75Y YieldGard expressing the Cry1Ab protein, BM780Pro YieldGard VTPRO expressing Cry1A.105 and Cry2Ab2 and Viptera expressing the Vip3Aa20 protein, and the non-transgenic variety BM207 (control), were weekly planted to ensure fresh leaves to the larvae throughout the experiment.

2.2. Influence of the maize hybrids on *S. frugiperda*

A total of 248 newly-hatched larvae were kept individually in 100ml plastic pots and fed with maize leaves of each hybrid. We used 55, 61, 72 and 60 randomly assigned newly hatched larvae to the control, YieldGard, YieldGard VTPRO and Viptera treatments, respectively. Fresh leaves, between V4 and V6 stages (Ritchie *et al.*, 1993), were replaced daily and larval survival was assessed every 12 hours. The experiment was conducted under the same environmental conditions described for colony maintenance.

The pupae were sexed, weighed 24 hours after pupation and kept individually in 100ml plastic pots lined with moistened filter paper at the bottom. After adult emergence, 20 pairs were formed for control, YieldGard and YieldGard VTPRO treatments. No larva survived when fed on the Viptera hybrid, thus preventing the formation of pairs. Each pair was maintained in PVC cages 20 cm diameter x 25 cm height lined on the wall with sulphite paper; the top was capped with TNT-like fabric and at the bottom a tray coated with filter paper. Adults were fed with 10% honey diluted in water, provided in a cotton ball soaked in the solution. The longevity of the adults, fecundity of females and egg viability were evaluated.

2.3. Statistical analysis

The statistical evaluations consisted in estimating how much the expression of the proteins of *B. thuringiensis* in the maize hybrids affected the survival, development and weight of *S. frugiperda*. All analyzes were performed in the R-Statistical System (R Development Core Team, 2015); survival analysis was performed using the survival packages of Therneau (2014) and MuMIn (Barton, 2014) under Weibull's distribution to estimate the mean time to death. From the results of the survival analysis, we estimated the development of individuals who survived the expression of proteins in hybrids in the larval phase. The results of pupal weight were normally distributed and were analyzed through analysis of variance and Tukey's test using the ExpDes package (Ferreira *et al.*, 2013). The other parameters of development were analyzed by the generalized linear model (GLM) with Poisson distribution and model simplification.

3. Results

Larval mortality of *S. frugiperda* fed with the hybrid Viptera reached 100% in the first instar ($X^2 = 286.79$, $df = 3$, $p < 0.05$) (Figure 1, Table 1). Both larval (35%) and pupal (30%) stages were prolonged in the YieldGard VTPRO hybrid compared to the non-transgenic hybrid (Table 1) ($F_{(2,117)} = 25.46$, $p < 0.05$). The larval stage in the YieldGard hybrid was approximately 10% longer than the control ($F_{(2,135)} = 56.83$, $p < 0.05$), and among the transgenic hybrids was the one with the lowest

mortality. The longevity of the surviving adults was not affected by the ingestion of transgenic maize during the larval phase ($F_{(2,117)} = 2.696$, $p = 0.072$) (Table 1).

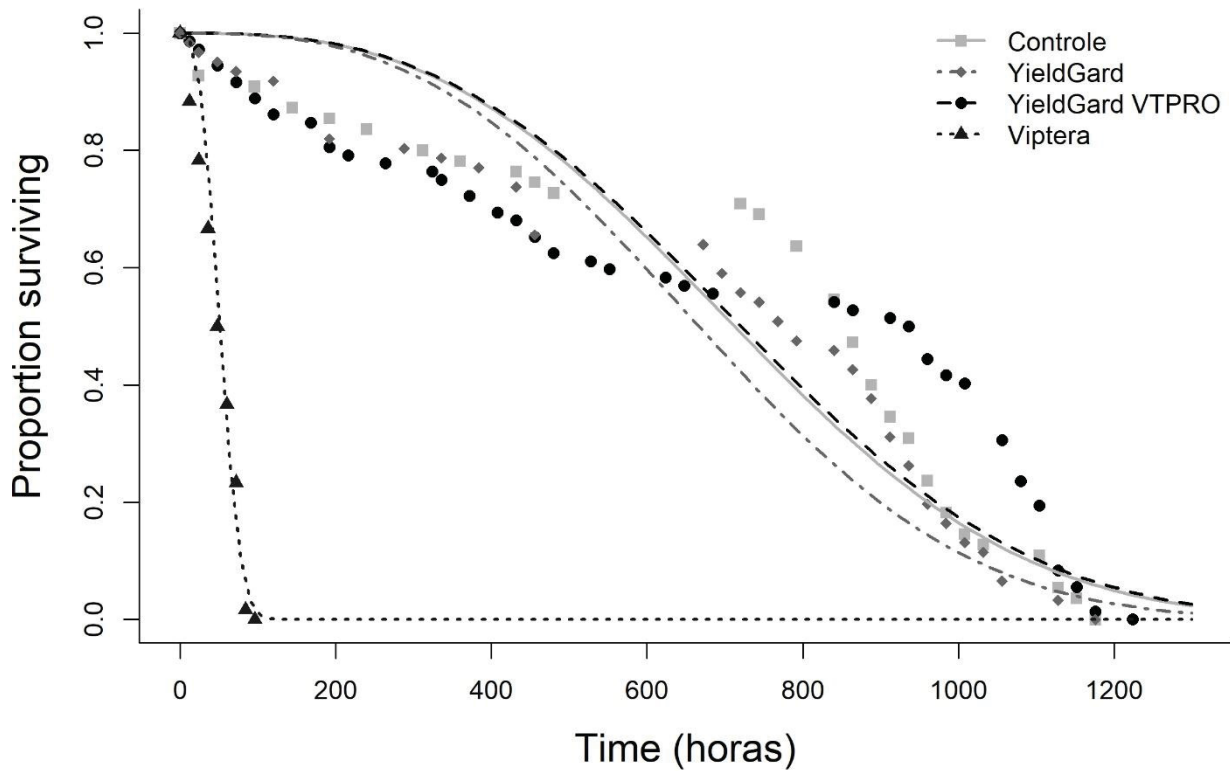


Figure 1. Survival of *Spodoptera frugiperda* fed in the larval stage on leaves of transgenic and conventional maize.

Table 1. Biological parameters of *Spodoptera frugiperda* surviving on transgenic maize expressing *Bacillus thuringiensis* Cry and Vip proteins (temperature de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 70% RH and fotoperiod of 14:10 h).

Treataments	Larval stage (days)	Larval mortality (%)	Pupal stage (days)	Pupal mortality (%)	Longevity (days) *ns
Control	15.24 \pm 0.32c n=45	18.18 (n=55-45)	9.70 \pm 0.34b n=40	11.11 (n=45-40)	13.50 \pm 0.44 n=40
YieldGard	16.07 \pm 0.17b n=46	24.59 (n=61-46)	9.47 \pm 0.32b n=40	13.04 (n=46-40)	12.15 \pm 0.62 n=40
YieldGard VTPRO	20.55 \pm 0.27a n=47	34.72 (n=72-47)	12.45 \pm 0.32a n=40	15 (n=47-40)	11.72 \pm 0.61 n=40

Viptera	-	100 (n=60-60)	-	-	-
---------	---	------------------	---	---	---

Means (\pm SE) followed by the same letter in columns do not statistically differ by contrast analysis at 0.05% significance. *ns means did not differ in analysis of variance.

Larval weight on the seventh day after hatching and pupal weight were lower on insect-resistant maize in comparison to the control (Figure 2). Larval weight was 77% lower in the Pro hybrid and 36% in the YieldGard compared to the non-transgenic hybrid ($F_{(2,135)}= 32.11$, $p < 0.05$) (Figure 2a). The pupal weight of Bt hybrids was significantly lower in relation to pupae obtained from the non-transgenic hybrid ($F_{(2,117)}= 10.98$, $p < 0.05$) (Figure 2b).

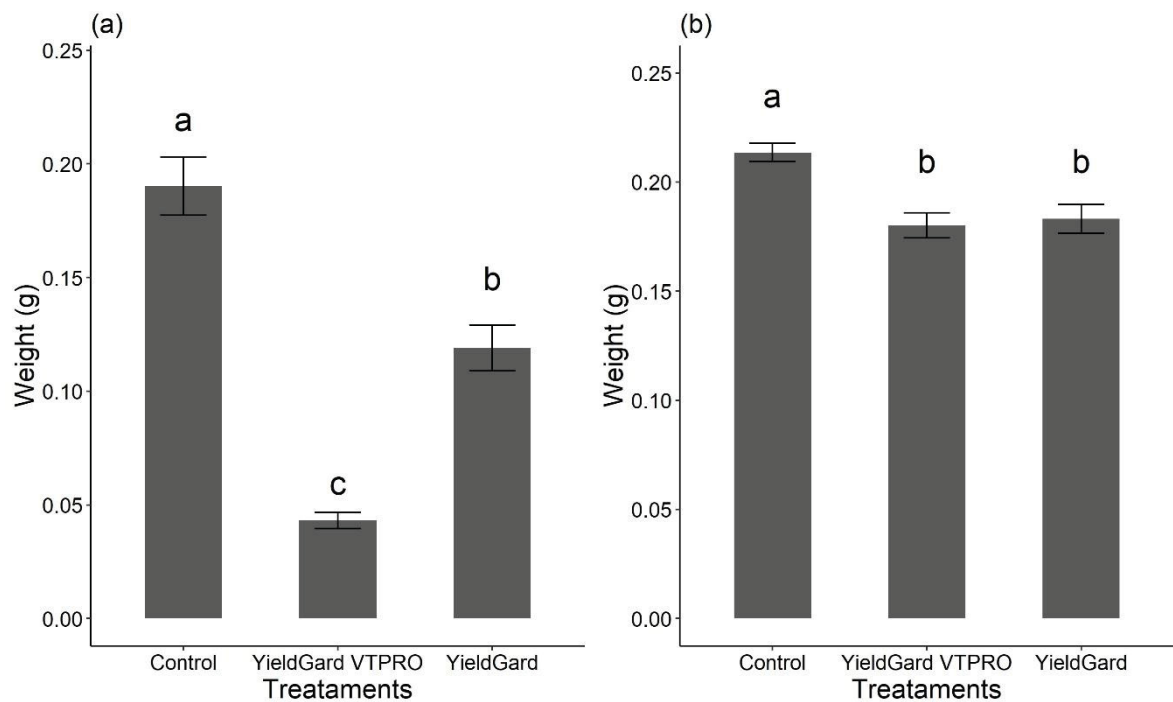


Figure 2. Effect of transgenic maize on the weight of seven day-old larvae (a) and pupae (b) of *Spodoptera frugiperda*. Means with the same letter for larval weight did not differ significantly by the generalized linear model and for Tukey's test for pupal weight ($p \leq 0.05$).

The fecundity of mated females was significantly affected by Bt maize consumption during the larval phase ($F_{(2,57)}= 6.40$, $p < 0.05$) (Figure 3a). Females from conventional maize laid about twice as many eggs as those from Bt plants (Figure 3a). The viability of the eggs, however, was not affected by the type of leaf consumed during the larval stage ($F_{(2,53)}= 0.57$, $p = 0.568$) (Figure 3b).

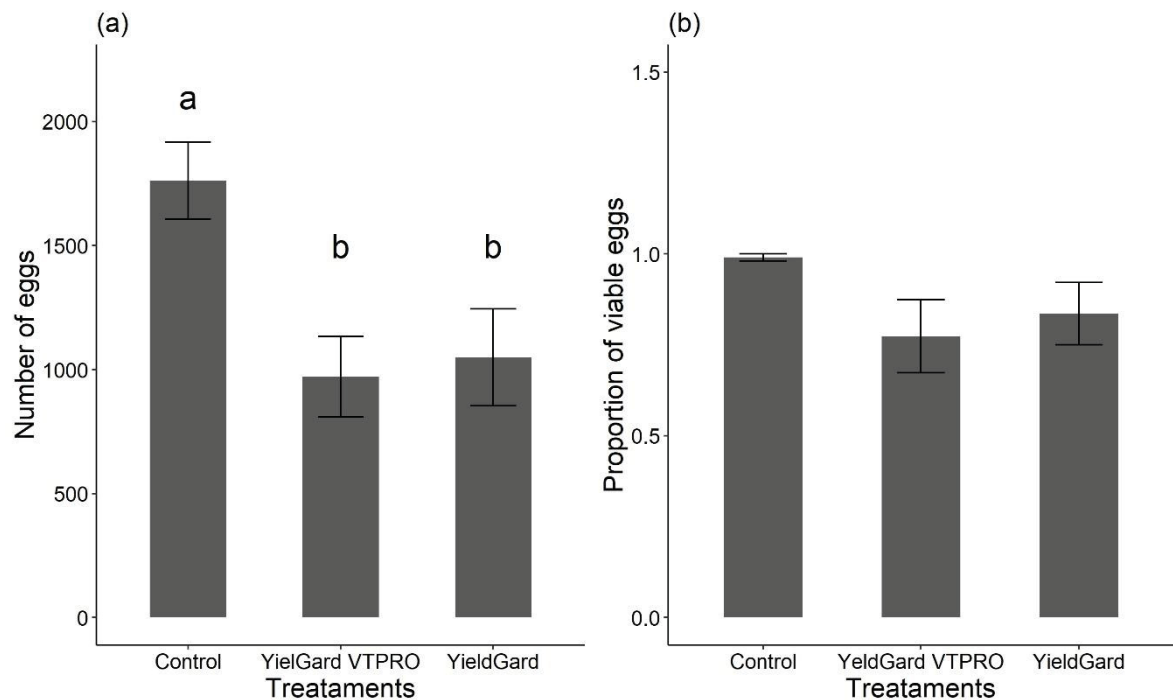


Figure 3. Effect of Bt maize on the fecundity and fertility of *Spodoptera frugiperda*. Means with the same letter did not differ significantly by contrast analysis ($p \leq 0.05$).

4. Discussion

The effects of Bt maize on the fall armyworm indicated high susceptibility of the larvae feeding on the hybrid Viptera, which expresses the protein Vip3Aa20. This hybrid efficiently controlled *S. frugiperda*, and all individuals died in the first instar. According to Bernardi *et al.* (2015; 2016a) the Brazilian population of the fall armyworm has a low frequency of Vip3Aa20 protein-resistant alleles, which indicates a low risk to the efficiency of this protein in the control of *S. frugiperda*, but points out to a potential risk for the evolution of resistance.

We observed tolerance of *S. frugiperda* to the other Bt hybrids, although larval feeding entailed development and reproductive costs to handle the effects of the toxic proteins on the development of the immature stages. The development time of larvae and pupae on YieldGard VTPRO hybrid were prolonged relative to the YieldGard and control treatments. In addition, fall armyworm larvae and pupae were smaller in the YieldGard VTPRO and YieldGard hybrids compared to the non-transgenic hybrid. Similar results were obtained for *S. frugiperda* fed with MON 810 hybrid expressing the Cry1Ab protein (Omoto *et al.*, 2016). The YieldGard VTPRO hybrid is a

pyramidal event which contains two *B. thuringiensis* toxins acting on the same target pest (Roush 1998). Thus, pyramidal plants provided a novel strategy to delay resistance on target pests (Zhao *et al.*, 2003; Carrière *et al.*, 2015). According to Niu *et al.* (2014) a strain of *S. frugiperda* from Puerto Rico resistant to Cry1F was susceptible to four pyramidal Bt maize hybrids. Bernardi *et al.* (2016b), recorded total mortality of newly hatched larvae of the fall armyworm from the susceptible population fed on leaves of the hybrid YieldGard VTPRO (Cry1A.105 + Cry2Ab2) and PowerCore (Cry1A.105+ Cry2Ab2 + Cry1F). However, a reduction in mortality was observed when larvae fed on style-stigmas and grains of these hybrids. Such failure is associated with the low biological activity of Bt proteins present in these structures, thus contributing to the evolution of resistance in *S. frugiperda* (Bernardi *et al.*, 2016b).

The population of *S. frugiperda* evaluated in this work can survive and reproduce when fed in the larval phase with the pyramidal maize, although displaying lower fecundity than the non - transgenic hybrid. On the other hand, egg fertility did not differ from the other treatments. This tolerance of target pests to pyramidal events has been reported for maize and cotton (Santos-Amaya *et al.*, 2015; Welch *et al.*, 2015). In addition, the population used in our study was only for the second time in contact with this pyramidal hybrid, indicating a rapid development of tolerance to it.

According to Hernández-Rodríguez *et al.* (2013) the fast development of resistance to pyramidal events containing the Cry1A.105 protein, such as YieldGard VTPRO, is related to the sharing of protein receptor sites in the gut of the target insect with the Cry1F protein. According to Carrière *et al.* (2015), the Cry1A.105 protein shares 76% of the identity of the amino acid sequences in relation to the Cry1Ab protein and 90% of the Cry1F (Bernardi *et al.*, 2015), thus enabling the survival of *S. frugiperda* to the hybrid, since the caterpillar is resistant to Cry1Ab, as demonstrated in our work in relation to the hybrid YieldGard.

The resistance of *S. frugiperda* to Cry proteins has been recorded in maize expressing the Cry1Ab and Cry1F proteins in the United States (Williams *et al.*, 1998; Lynch *et al.*, 1999; Buntin *et al.*, 2001), in Puerto Rico for Cry1F protein (Storer *et al.*, 2012), and in Paraguay for Bt maize

expressing Cry1Ab and Cry1F (Gomez *et al.*, 2017). In Brazil, resistance of *S. frugiperda* to maize expressing Cry1Ab, CryFa, Cry1F is recorded in the main grain producing states of the country (Fernandes *et al.*, 2003; Okumura *et al.*, 2013; Monnerat *et al.*, 2015; Omoto *et al.*, 2016). In the tropics, maize is grown during most part of the year, allowing the occurrence of multiple and overlapping generations of *S. frugiperda*, a condition that increases the selection pressure of Bt plants for resistant individuals (Tomquelski & Martins, 2007; Storer *et al.*, 2012; Farias *et al.*, 2014a). Our work describes for the first time the survival and reproduction of *S. frugiperda* reared in the larval stage on leaves of the pyramidal hybrid YieldGard VTPRO in Brazil. Fatoretto *et al.* (2017) mention the tolerance of the fall armyworm to this hybrid without stating the source of the information or the geographical area where the observation was recorded.

In addition to climatic conditions, the genetic variability between the geographically distinct populations confers different degrees of susceptibility of *S. frugiperda* to Bt proteins (Monnerat *et al.*, 2006). In the United States the highest allelic frequency of resistance of *S. frugiperda* population to Cry1F protein is concentrated in the southeast of the coastal region (Huang *et al.*, 2014). In Brazil resistance of *S. frugiperda* is concentrated in the main producing regions. Farias *et al.* (2014b) tested 43 Brazilian *S. frugiperda* populations with 2,000ng Cry1F per square centimeter of artificial diet and observed increased survival over the seasons (2010 to 2013) and higher survival (50%) in the populations of Bahia, Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso Sul and Paraná.

Among the resistance control strategies already discussed, such as the use of pyramidal plants that do not have proteins with cross-resistance, Zhao *et al.*, (2003) propose the adoption of three measures to delay resistance in Bt plants: 1 - high expression of toxic genes so that all susceptible species will be killed, 2 - use of refuge area and 3 - use of varieties that express different proteins. In addition, transgenic plants expressing Bt proteins should be used within the context of integrated pest management to reduce resistant populations, since natural enemies contribute to pest control and consequently to reduce pest resistance (Kos *et al.*, 2009).

Despite recommendations, there is limited adoption of refuge areas in Brazil (Bernardi *et al.*, 2015), thus increasing the pressure for selection of resistant individuals (Farias *et al.*, 2014a). The low adoption of refuge areas was proposed by Head and Greenplate (2012), as one of the reasons for the development of resistance of the maize stalk borer *Busseola fusca* (Full.) (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ab in South Africa, the pink bollworm *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae) to Cry1Ac in India, and *S. frugiperda* to Cry1F in Puerto Rico. Vip3Aa20 protein appears to be one of the few alternatives among transgenic plants to control *S. frugiperda* (Santos-Amaya *et al.*, 2015), since the mode of action of Vip proteins differs from the mode of action of Cry proteins (Lee *et al.*, 2003). Currently in the market there are combinations of proteins within the same family as the crystal insecticidal proteins Cry or associated to different families of proteins, such as Cry and the vegetative insecticides Vips (Carrière *et al.*, 2016). There are records of cross resistance among proteins of the group Cry, but no indication of cross-resistance between Cry and Vip3A proteins (Burkness *et al.*, 2010; Horikoshi *et al.*, 2016). Increasing the planted area with maize expressing Vip3Aa20 may expose *S. frugiperda* populations to a high selection pressure, and thus favour the increase of allelic resistance frequency, if resistance management strategies are not adopted (Bernardi *et al.*, 2015).

Transgenic plants expressing *B. thuringiensis* proteins are an efficient tool for controlling the target pest as well as reducing the use of broad spectrum insecticides (Wolfenbarger & Phifer, 2000). However, with the widespread use of this technology, monitoring and management of insect resistance will be increasingly important to ensure the efficiency of Bt plants on insect pests (Tabashnik *et al.*, 2009). The data presented in our study corroborate the urgent need to implement strategies for the management of *S. frugiperda* resistance to maize expressing Bt toxin in Brazil, in order to preserve the benefits provided by this technology and to prolong its efficiency in the control of the target pest.

5. References

- Aktar, W., Sengupta, D., and Chowdhury, A. (2009) Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2, 1-12.
- Andow, D. A. (2008). The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. *Collections of biosafety Reviews*, 4, 142-199.
- Barros, E.M., Torres, J.B. and Bueno, A.F. (2010) Oviposition, development, and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different hosts of economic importance. *Neotropical Entomology*, 39, 996-1001.
- Barton, K. (2014) MuMIn: Multi-model inference. R package version 1.10.5.
- Bernardi, D., Bernardi, O., Horikoshi, R.J., Salmeron, E., Okuma, D.M., and Omoto, C. (2016b) Biological activity of Bt proteins expressed in different structures of transgenic corn against *Spodoptera frugiperda*. *Ciência Rural*, 46, 1019-1024.
- Bernardi, D., Salmeron, E., Horikoshi, R.J., Bernardi, O., Dourado, P.M., Carvalho, R.A. *et al.* (2015) Cross-resistance between Cry1 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current pyramided Bt maize hybrids in Brazil. *PLoS One*, 10, e0140130.
- Bernardi, O., Bernardi, D., Horikoshi, R.J., Okuma, D.M., Miraldo, L.L., Fatoretto, J. *et al.* (2016a) Selection and characterization of resistance to the Vip3Aa20 protein from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda*. *Pest management science*, 72, 1794-1802.
- Blanco, C.A., Chiaravalle, W., Dalla-Rizza, M., Farias, J.R., García-Degano, M.F., Gastaminza, G. *et al.* (2016) Current situation of pests targeted by Bt crops in Latin America. *Current Opinion in Insect Science*, 15, 131-138.

- Buntin, G.D., Lee, R.D., Wilson, D.M., and McPherson, R. M. (2001) Evaluation of YieldGard transgenic resistance for control of fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) on corn. *Florida Entomologist*, 1, 37-42.
- Burkness, E.C., Dively, G., Patton, T., Morey, A.C., and Hutchison, W.D. (2010) Novel Vip3A *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize approaches high-dose efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) under field conditions: Implications for resistance management. *GM crops*, 1, 337-343.
- Carrière, Y., Crickmore, N., and Tabashnik, B.E. (2015) Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. *Nature biotechnology*, 33, 161.
- Casida, J.E. (2009) Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. *Chemical research in toxicology*, 22, 609-619.
- Casida, J.E. and Quistad, G.B. (1998) Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annual review of entomology*, 43, 1-16.
- Catarino, R., Ceddia, G., Areal, F.J. and Park, J. (2015) The impact of secondary pests on *Bacillus thuringiensis* (Bt) crops. *Plant Biotechnology Journal*, 13, 601–612.
- Companhia Nacional de Abastecimento -CONAB. (2017) Acompanhamento da safra brasileira de grãos, Safra 2016/17 - Décimo segundo levantamento, Brasília, 4: 1-158.
- Devine, G.J. and Furlong, M.J. (2007) Insecticide use: contexts and ecological consequences. *Agriculture and Human values*, 24, 281-306.
- Farias, J.R., Andow, D.A., Horikoshi, R.J., Sorgatto, R.J., Fresia, P., Santos, A. C., *et al.* (2014a) Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Protection*, 64, 150-158.

- Farias, J.R., Horikoshi, R.J., Santos, A.C. and Omoto, C. (2014b) Geographical and temporal variability in susceptibility to Cry1F toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, 107, 2182-2189.
- Fatoretto, J., Andrew, P. Michel, A.P., Silva Filho, M.C. and Silva, N. (2017) Adaptive potential of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) limits Bt trait durability in Brazil, *Journal of Integrated Pest Management*, 8, 1–10.
- Fernandes, O.D., Parra, J.R., Neto, A.F., Pícoli, R., Borgatto, A.F. and Demétrio, C.G. (2003) Efeito do milho geneticamente modificado MON810 sobre a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 2, 25-35.
- Ferreira, E.B., Cavalcanti, P.P. and Nogueira, D.A. (2013) ExpDes: Experimental Designs package. R package version 1.1.2.
- Gomez, V.A., Villalba, G.E., Arias, O.R., Ramirez, M.B. and Gaona, E.F. (2017) Toxicity of the Bt protein expressed in leaves of different events of transgenic corn released in Paraguay against *Spodoptera frugiperda* (Smith)(Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 76, 1-10.
- Head, G.P. and Greenplate, J. (2012) The design and implementation of insect resistance management programs for Bt crops. *GM Crops & Food*, 3, 144-153.
- Hernández-Rodríguez, C.S., Hernández-Martínez, P., Van Rie, J., Escriche, B. and Ferré, J. (2013) Shared midgut binding sites for Cry1A. 105, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis* in two important corn pests, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. *PloS One*, 8, e68164.

- Horikoshi, R.J., Bernardi, D., Bernardi, O., Malaquias, J.B., Okuma, D.M., Miraldo, L.L. *et al.* (2016) Effective dominance of resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt maize and cotton varieties: implications for resistance management. *Scientific Reports*, 6, 34864.
- Huang, F., Qureshi, J.A., Meagher Jr, R.L., Reisig, D.D., Head, G.P., Andow, D.A. *et al.* (2014) Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. *PLoS One*, 9, e112958.
- James, C. (2016) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. *ISAAA Brief No. 52*.
- Kasten, Jr.P., Precetti, A.A.C.M. and Parra, J.R.P. (1978) Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* em duas dietas artificiais e substrato natural. *Revista de Agricultura*, 53, 68-78.
- Kesavachandran, C. N., Fareed, M., Pathak, M. K., Bihari, V., Mathur, N., & Srivastava, A. K. (2009). Adverse health effects of pesticides in agrarian populations of developing countries. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 200* (pp. 33-52). Springer, Boston, MA.
- Kos, M., van Loon, J.J., Dicke, M. and Vet, L.E. (2009) Transgenic plants as vital components of integrated pest management. *Trends in biotechnology*, 27, 621-627.
- Lee, M.K., Walters, F.S., Hart, H., Palekar, N. and Chen, J.S. (2003) The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4648-4657.
- Lynch, R.E., Wiseman, B.R., Plainsted, D. and Warnik, D. (1999) Evaluation of transgenic sweet corn hybrids expressing Cry1A(b) toxin for resistance to corn earworm and fall armyworm. *Journal Economic Entomology*, 92, 246-252.

- Monnerat, R., Martins, E., Macedo, C., Queiroz, P., Praça, L., Soares, C. M. *et al.* (2015) Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. *PLoS One*, 10, e0119544.
- Monnerat, R., Martins, E., Queiroz, P., Ordúz, S., Jaramillo, G., Benintende, G. *et al.* (2006) Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7029-7035.
- Niu, Y., Yang, F., Dungal, V. and Huang, F. (2014) Larval survival and plant injury of Cry1F-susceptible,-resistant, and-heterozygous fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on non-Bt and Bt corn containing single or pyramided genes. *Crop Protection*, 59, 22-28.
- O'Callaghan, M., Glare, T.R., Burgess, E.P.J. and Malone, L.A. (2005) Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. *Annual Review of Entomology* 50, 271–292
- Okumura, R.S., Cinque M.D., Dallacort, R., Zorzenoni, T.O., Zaccheo, P.V.C. *et al.* (2013) Agronomic efficiency of *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize hybrids in pests control on Lucas do Rio Verde city, State of Mato Grosso, Brazil. *African Journal of Agricultural Research*, 8, 2232-2239.
- Omoto, C., Bernardi, O., Salmeron, E., Sorgatto, R. J., Dourado, P. M., Crivellari, A. *et al.* (2016) Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Management Science*, 72, 1727-1736.
- Papadakis, E. N., Tsaboula, A., Kotopoulou, A., Kintzikoglou, K., Vryzas, Z., & Papadopoulou-Mourkidou, E. (2015). Pesticides in the surface waters of Lake Vistonis Basin, Greece:

Occurrence and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, 536 (1), 793-802.

Pogue, G.M. (2002) A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). *Memoirs of the American Entomological Society*, 43, 1-202.

R Development Core Team. (2015) R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*.

Ritchie, S.W., Hanway, J.J. and Benson, G.O. (1993) How a corn plant develops. *Ames, Iowa State University of Science and Technology*, 26p.

Roubos, C.R., Rodriguez-Saona, C., Holdcraft, R., Mason, K. S. and Isaacs, R. (2014) Relative toxicity and residual activity of insecticides used in blueberry pest management: mortality of natural enemies. *Journal of economic entomology*, 107, 277-285.

Roush, R.T. (1998) Two-toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not?. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 353, 1777-1786.

Santos-Amaya, O.F., Rodrigues, J.V., Souza, T.C., Tavares, C.S., Campos, S.O., Guedes, R.N. *et al.* (2015) Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. *Scientific Reports*, 5, 18243.

Shelton, A.M., Zhao, J.Z. and Roush, R.T. (2002) Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual Review of Entomology*, 47, 845-881.

- Silva, S.M., Cunha, J.P.A.R.D., Carvalho, S.M.D., Zandonadi, C.H.S., Martins, R.C. and Chang, R. (2017) *Ocimum basilicum* essential oil combined with deltamethrin to improve the management of *Spodoptera frugiperda*. *Ciência e Agrotecnologia*, 41, 665-675.
- Storer, N.P., Kubiszak, M.E., King, J.E., Thompson, G.D. and Santos, A.C. (2012) Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110, 294-300.
- Tabashnik, B.E., Carriere, Y., Dennehy, T.J., Morin, S., Sisterson, M.S., Roush, R.T. *et al.* (2003) Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. *Journal of Economic Entomology* 96, 1031-1038
- Tabashnik, B.E., Van Rensburg, J.B.J. and Carrière, Y. (2009) Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. *Journal of Economic Entomology*, 102, 2011-2025.
- Therneau, T.A. (2014) Package for Survival Analysis in S. R package version 2.37-7.
- Tomquelski, G.V. and Martins, G.L.M. (2007) Eficiência de inseticidas sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho na região dos Chapadões. *Revista Brasileira Milho Sorgo*, 6, 26–39.
- Valicente, F.H. (2015) Manejo integrado de pragas na cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa. *Circular técnica n° 208*. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/125260/1/circ-208.pdf>>. Acesso em: 30 julho. 2018. Citado nas páginas 19, 21-33.
- Waquil, J.M., Dourado, P.M., Carvalho, R.A., Oliveira, W.S., Berger, G.U., Head, G.P. *et al.* (2013) Manejo de lepidópteros-praga na cultura do milho com o evento Bt piramidado Cry1A. 105 e Cry2Ab2. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48, 1529-1537.

- Welch, K.L., Unnithan, G.C., Degain, B.A., Wei, J., Zhang, J., Li, X. *et al.* (2015) Cross-resistance to toxins used in pyramided Bt crops and resistance to Bt sprays in *Helicoverpa zea*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 149-156.
- Williams, W.P., Buckley, P.M., Sagers, J.B. and Hanten J.A. (1998) Evaluation of transgenic corn for resistance to corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae), fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae), and southwestern corn borer (Lepidoptera: Crambidae) in a laboratory bioassay. *Journal of Agricultural Entomology*, 15, 105-112.
- Wolfenbarger, L.L. and Phifer, P.R. (2000) The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science*, 290, 2088-2093.
- Yu, S.J. (2006) Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). *Pesticide biochemistry and physiology*, 84, 135-142.
- Zhao, J.Z., Cao, J., Li, Y., Collins, H.L., Roush, R.T., Earle, E. D. *et al.* (2003) Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nature Biotechnology*, 21, 1493.

Capítulo 3: Efeito de dois híbridos de milho Bt sobre o desenvolvimento e a reprodução do parasitoide larval *Campoletis sonorensis* (Cameron, 1886) (Hymenoptera: Ichneumonidae)

Resumo

Não existe consenso acerca do efeito das plantas transgênicas resistentes a insetos sobre organismos não alvo, como os parasitoides. Deste modo, o objetivo foi avaliar o efeito dos híbridos de milho transgênico YieldGard VTPRO e YieldGard e o híbrido não transgênico BM207 na biologia de *Campoletis sonorensis* (Cameron, 1886), parasitando lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com esses híbridos. Visto que não existem estudos que investigaram os efeitos das proteínas tóxicas utilizadas nesse trabalho, para *C. sonorensis*, nossa hipótese é a de que o milho transgênico afeta negativamente a biologia desse parasitoide. O trabalho foi conduzido em laboratório com lagartas de *S. frugiperda* parasitadas e criadas em folhas de milho durante a fase larval. Os parasitoides adultos receberam mel para alimentação. Foram avaliados o tempo de desenvolvimento, a mortalidade, o peso das pupas, a longevidade e a fecundidade de *C. sonorensis*. A mortalidade larval do parasitoide em lagartas de *S. frugiperda* foi maior nos híbridos transgênicos. Houve diferença estatística para o período de desenvolvimento larval e pupal de *C. sonorensis* entre os híbridos transgênicos e o controle. Apenas 2,22% das larvas do parasitoide que se alimentaram da lagarta-do-cartucho criadas no híbrido YieldGard VTPRO atingiram a fase adulta. A mortalidade do parasitoide na fase de pupa foi maior nos híbridos transgênicos YieldGard VTPRO (34%) e YieldGard (20%). Estes híbridos afetaram o peso das pupas e a fecundidade das fêmeas. A longevidade dos adultos não foi afetada pelos híbridos testados; no entanto, a longevidade das fêmeas foi maior no híbrido não transgênico. Conclui-se que os híbridos transgênicos são uma barreira para a manutenção e a sobrevivência de *C. sonorensis*, tanto pela alta mortalidade causada por YieldGard VTPRO, quanto pelo impacto no desenvolvimento e reprodução causado por YieldGard VTPRO e YieldGard.

Palavras-chave: parasitismo larval, sobrevivência, reprodução, Cry.

**Effect of two Bt maize hybrids on the development and reproduction of the larval parasitoid
Campoletis sonorensis (Cameron, 1886) (Hymenoptera: Ichneumonidae)**

Abstract

The results on the effects of Bt plants on parasitoids are controversial. The objective of this study was to evaluate the effect of YieldGard VTPRO and YieldGard transgenic maize hybrids and the non-transgenic hybrid BM207 on the biology of *Campoletis sonorensis* (Cameron, 1886) (Hymenoptera: Ichneumonidae), parasitizing larvae of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Since there are no studies investigating the effects of these toxic proteins on *C. sonorensis*, our hypothesis is that transgenic maize negatively affects the biology of this parasitoid. The work was conducted in laboratory with parasitized *S. frugiperda* caterpillars reared on corn leaves during the larval phase. The development time, mortality, pupal weight, longevity and fecundity of *C. sonorensis* were evaluated. Larval mortality of the parasitoid was higher in the transgenic hybrids. There was statistical difference for the larval and pupal development period of *C. sonorensis* between the transgenic hybrids and the control. Only 2.22% of the larvae of the parasitoid that fed larvae reared on the YieldGard VTPRO hybrid reached the adult stage. Pupal parasitoid mortality was higher in the YieldGard VTPRO (34%) and YieldGard (20%) transgenic hybrids. These transgenic hybrids affected pupal weight and females' fecundity. Adult longevity was not affected by the hybrids evaluated; however, females' longevity was higher in the non-transgenic hybrid. It is concluded that transgenic hybrids are a barrier to the maintenance and survival of *C. sonorensis* in these hybrids, both due to the high mortality caused by YieldGard VTPRO and the impact on development and reproduction caused by YieldGard VTPRO and YieldGard.

Key-Words: larval parasitism, survival, reproduction; Cry.

1. Introdução

Inimigos naturais desempenham um papel importante na regulação de populações de insetos-pragas, e os programas de manejo integrado de pragas buscam harmonizar a sobrevivência desses inimigos naturais com o uso de inseticidas (Altieri, 1999).

Com a rápida expansão das culturas que expressam proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis* (culturas Bt), muitos estudos sobre potenciais impactos tritróficos de plantas geneticamente modificadas vem sendo realizados (O’Callaghan et al. 2005). Plantas Bt contribuem para a redução no uso de inseticidas químicos e, sua adoção, pelos agricultores, favorece a sobrevivência e a participação de parasitoides nos programas de manejo de pragas baseados no controle biológico (Betz et al. 2000; Cattaneo et al. 2006; Romeis et al. 2006; Blanco et al. 2016; Guo et al 2016). No entanto, impactos negativos sobre a biologia de parasitoides tem sido relatados na bibliografia (Baur & Boethel 2003), porém tais efeitos se relacionam à menor qualidade dos hospedeiros devido aos efeitos das plantas Bt sobre os herbívoros, como menor peso e desenvolvimento mais lento (Romeis et al. 2006; Frizzas e Oliveira, 2006; Resende et al. 2016), do que à toxicidade das proteínas tóxicas aos parasitoides. Sendo que parasitoides desenvolvidos em larvas de linhagens resistentes a plantas Bt não são afetados (Schuler et al. 2003, 2004; Chen et al. 2008; Tian et al. 2014).

A área cultivada com milho Bt no Brasil, na safra de 2017, foi de 17.55 milhões de hectares (James, 2017), o que evidencia a importância de se conhecer o impacto dessas proteínas tóxicas sobre herbívoros e seus parasitoides. *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é a principal praga alvo do milho nas Américas e é a primeira praga de culturas bem documentada a ter desenvolvido resistência a plantas Bt (Tian et al. 2014). Essa resistência proporcionou a oportunidade de usá-la para estudos de interações tritróficas com inimigos naturais de *S. frugiperda* (Tian et al. 2014), tendo em vista que os parasitoides podem contribuir para o controle de insetos resistentes.

Dentre o complexo de parasitoides associados a *S. frugiperda*, destaca-se *Campoletis sonorensis* (Cameron, 1886), um ichneumonídeo endoparasitoide larval solitário de *S. frugiperda*, e de outros noctuídeos de importância agrícola, como *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781) e

Helicoverpa zea (Boddie, 1850) (Elzen, 1983). Devido à escassez de dados sobre o impacto das principais toxinas Bt utilizadas nos híbridos de milho sobre o parasitoide *C. sonorensis*, este trabalho teve por objetivo comparar o desenvolvimento e a reprodução desse endoparasitoide larval solitário, desenvolvendo-se em larvas de *S. frugiperda* alimentadas com três híbridos de milho transgênico e um híbrido convencional.

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal

Os híbridos transgênicos comerciais 30K75Y YieldGard (Cry1Ab) e BM780Pro YieldGard VTPRO (Cry1A.105 e Cry2Ab2), além do híbrido não transgênico BM207 (controle), foram utilizados nos ensaios. As sementes foram plantadas a cada semana, a fim de garantir material vegetal de mesma idade no decorrer dos ensaios. Foram utilizadas nos experimentos plantas que estavam entre os estádios V4 e V6 (Ritchie et al., 1993). As folhas utilizadas nos ensaios foram limpas em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e cortadas em porções de aproximadamente 7 cm x 4 cm.

2.2. Criação de *S. frugiperda* e *C. sonorensis*

As lagartas de *S. frugiperda* e os adultos de *C. sonorensis* usados nos ensaios foram provenientes da quarta e da terceira gerações, respectivamente, de uma colônia iniciada com lagartas coletadas em uma lavoura de milho de Cry1A.105/Cry2Ab2 e Cry1Ab, na segunda safra de 2016 e 2017, na Fazenda Canarinho (56°49'44.741"W e 14°9'6.923"S), em Nortelândia, Mato Grosso.

A criação de *S. frugiperda* foi conduzida em laboratório seguindo a metodologia descrita por Kasten et al. (1978) e de *C. sonorensis* seguiu a metodologia de Sanders et al. (2007). As criações e os ensaios foram realizados em uma sala com temperatura controlada de 26 ± 2 °C, 70% de umidade relativa e fotoperíodo 14:10 h (L:D).

Os adultos de *C. sonorensis* foram mantidos em potes de vidro de 1 litro vedado com tecido tipo TNT, e alimentados diariamente com solução de mel a 20% e água. Para a obtenção de hospedeiros parasitados, lagartas de *S. frugiperda* de segundo instar foram disponibilizadas para os

parasitoides em pequenas seções de dieta artificial diariamente. Após a oviposição, as lagartas foram transferidas individualmente para potes de 100 ml, com dieta artificial, e mantidas conforme os parâmetros descritos anteriormente. Pupas dos parasitoides foram coletadas e transferidas para tubos de ensaio até a emergência dos adultos.

2.3. Desenvolvimento de *C. sonorensis* em lagartas de *S. frugiperda* em milho transgênico e não transgênico

Foram utilizadas lagartas de *S. frugiperda* de segundo instar; as lagartas recém-eclodidas foram alimentadas com folhas de milho não transgênico até o segundo instar, para evitar sua morte antes da oferta ao parasitoide. No segundo instar, 40 lagartas foram expostas a dois casais de *C. sonorensis* em gaiolas de vidro de 500 ml, com abertura tampada com TNT. Durante 7 dias, foram utilizadas quatro gaiolas por dia, cada uma com 40 lagartas de *S. frugiperda*, para obter a quantidade de lagartas parasitadas em cada tratamento. Após 24 horas do início da exposição, as lagartas foram individualizadas em potes de 100 ml contendo papel filtro (3 cm x 3 cm) umedecido e um pedaço (7 cm x 4 cm) de folha de cada tratamento. Os potes foram mantidos em sala climatizada, conforme os parâmetros descritos anteriormente.

Diariamente, foi realizada a higienização dos potes, com retirada das fezes e substituição das folhas dos híbridos. Para obter o mínimo de parasitoides adultos para a formação de 10 casais em caso de sobrevivência, foram utilizadas 54 lagartas de *S. frugiperda* parasitadas do híbrido não transgênico; para os híbridos transgênicos YieldGard VTPRO e YieldGard, foram utilizadas 450 e 58 lagartas parasitadas, respectivamente. As pupas dos parasitoides foram retiradas dos potes 24 horas após sua formação, pesadas e individualizadas em tubos de ensaio até a emergência dos adultos. O desenvolvimento e a mortalidade do hospedeiro parasitado foram registrados diariamente. Os parâmetros avaliados incluíram o tempo do desenvolvimento larval e pupal de *C. sonorensis* e o peso da pupa do parasitoide.

Com base nos adultos de *C. sonorensis* emergidos no experimento anterior, foram avaliadas a fecundidade e a longevidade. Os casais foram separados em potes de vidro de 500 ml, e alimentados

com solução de 20% de mel e água em algodão. Por 24 horas, foram ofertadas 10 lagartas de *S. frugiperda*, em potes de 30 ml que continham folha de milho não transgênico, para cada casal de *C. sonorensis*. Esse processo foi realizado durante 10 dias. As lagartas parasitadas foram individualizadas em potes de 30 ml e receberam dieta artificial até a emergência dos adultos e a verificação do parasitismo.

2.4. Análise estatística

A análise estatística consistiu em verificar o quanto a expressão das proteínas de *B. thuringiensis* em híbrido de milho afetou a sobrevivência ao longo da vida de *C. sonorensis*. Todas as análises foram executadas no Sistema Estatístico R (R Development Core Team, 2015) usando os pacotes Survival (Therneau, 2014) e MuMIn (Bartón, 2014). Com base nos resultados da análise de sobrevivência, foram analisados no Sistema Estatístico R os dados de desenvolvimento e reprodução obtidos no teste de Shapiro-Wilk. A longevidade de machos e fêmeas em cada tratamento foi analisada por meio da análise de variância, e, a comparação da longevidade entre os sexos, em cada tratamento, foi realizada por meio do teste T. Os demais parâmetros de desenvolvimento e reprodução foram analisados pelo modelo linear generalizado (GLM), sob distribuição de Poisson e simplificação de modelo.

3. Resultados

A mortalidade de *C. sonorensis* em lagartas de *S. frugiperda* no híbrido transgênico de 88% no YieldGard VTPRO que contém as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 (Figura 1 e Tabela 1) ($X^2 = 742.91$, $df = 3$, $p < 0.05$). Nesses híbridos a maior mortalidade ocorreu na fase larval, principalmente nos cinco primeiros dias após a exposição dos hospedeiros aos híbridos Bt.

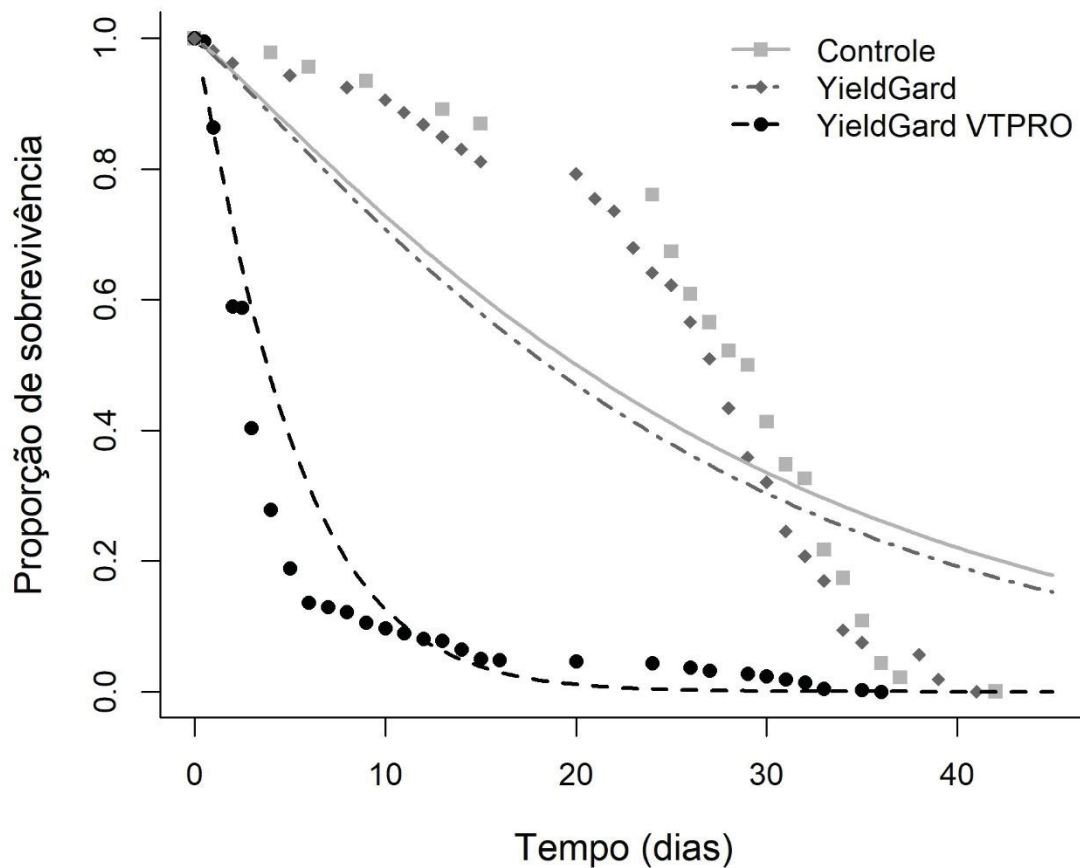


Figura 1. Sobrevivência de *Campoplex sonorensis* em lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com híbridos de milho transgênicos e não transgênico.

Houve prolongamento do período larval de *C. sonorensis* nos híbridos transgênicos YieldGard (10%) e YieldGard VTPRO (20%) ($F_{(2,156)} = 20.62, p < 0.05$) em relação ao híbrido não transgênico. O período de pupa foi estatisticamente maior nos híbridos transgênicos em relação ao híbrido controle ($F_{(2,126)} = 16.494, p < 0.05$) (Tabela 1). A mortalidade na fase de pupa de *C. sonorensis* foi maior nos híbridos transgênicos YieldGard VTPRO (34%) e YieldGard (20%). O peso das pupas de *C. sonorensis* foi menor nos híbridos transgênicos em relação ao controle, sendo que no híbrido YieldGard VTPRO foi menor que no YieldGard ($F_{(2,153)} = 30.447, p < 0.05$) (Figura 2).

Tabela 1. Parâmetros biológicos de *Campoletis sonorensis* desenvolvida em lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com híbridos de milho Bt e não transgênico.

Tratamentos	Período larval ¹ (dias)	Mortalidade larval	Período pupal ¹ (dias)	Mortalidade pupal
Controle	10,72±0,16b n = 51	5,90% n = 54	6,58±0,09b n = 48	5,88% n = 51
YieldGard VTPRO Cry1A.105/Cry2Ab2	12,31±0,20a n = 52	88,44% n = 450	7,50±0,15a n = 32	38,46% n = 52
YieldGard Cry1Ab	11,60±0,17a n = 53	8,62% n = 58	7,27±0,12a n = 45	15,10% n = 53

¹Médias (±erro padrão) seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo modelo linear generalizado a 0,05% de significância.

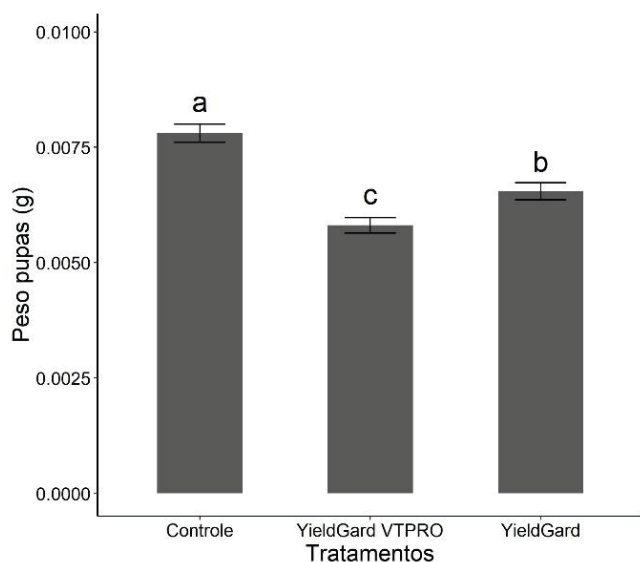


Figura 2. Peso das pupas de *Campoletis sonorensis* após o desenvolvimento em lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com híbridos de milho Bt e não transgênico. Médias (±erro padrão) com a mesma letra não diferem significativamente por modelo linear generalizado a 0,05%.

A longevidade de fêmeas e machos não foi estatisticamente diferente (fêmeas $F_{(2,47)} = 2.826$, $p = 0.069$) (machos $F_{(2,47)} = 1.458$, $p = 0.243$) entre os tratamentos YieldGard VTPRO (casais n=10), YieldGard (casais n=20) e controle (casais n=20). No entanto, a longevidade das fêmeas foi estatisticamente maior que a dos machos no híbrido controle ($F_{(1,38)} = 5.4098$, $p < 0.05$) (Figura 3).

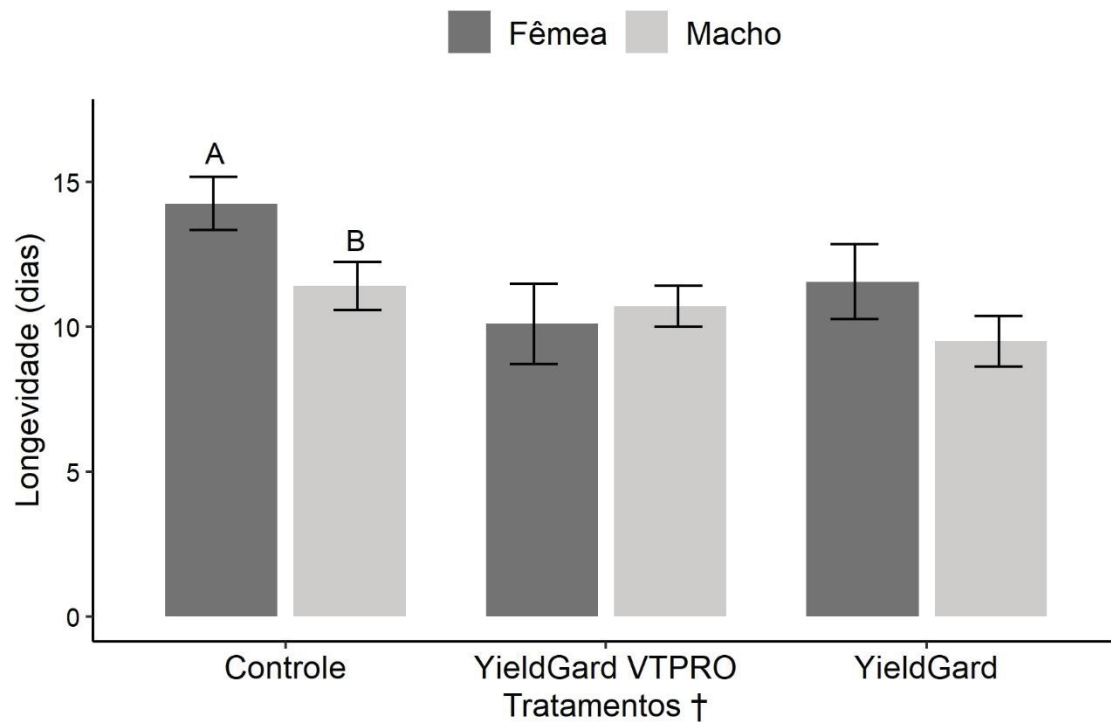


Figura 3. Longevidade de *Campoletis sonorensis* em *Spodoptera frugiperda* alimentadas com híbridos Bt e não Bt. Médias (\pm erro padrão) seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste T em relação à longevidade entre os sexos em cada híbrido.† não houve diferença para a longevidade de machos e fêmeas entre os tratamentos.

A reprodução de *C. sonorensis* obtidos de hospedeiros alimentados com híbridos transgênicos foi significativamente afetada, visto que a média de lagartas parasitadas por dia foi menor nos híbridos transgênicos em relação ao controle, porém entre os híbridos não houve diferença estatística ($F_{(2,47)} = 3.624, p = 0.034$) (Figura 4).

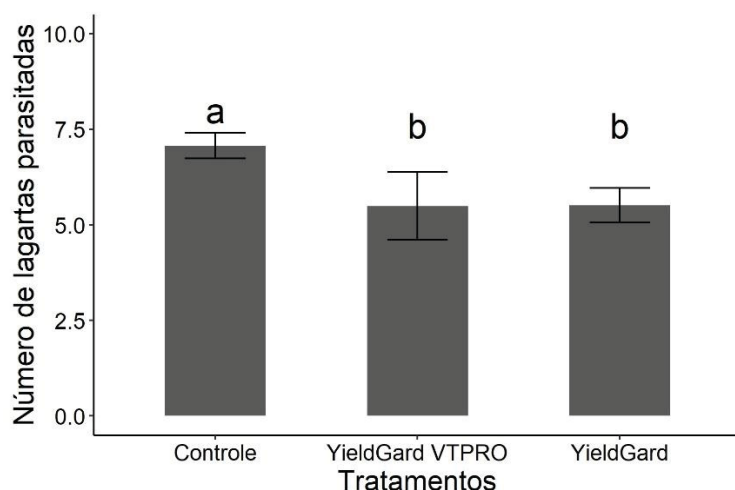


Figura 4. Média do parasitismo diário de *Campoplex sonorensis*. As médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo modelo linear generalizado a 0,05%.

4. Discussão

A sobrevivência de *C. sonorensis* foi menor nos híbridos Bt, sendo que as lagartas parasitadas morreram nos primeiros cinco dias, em média após a exposição às proteínas Cry1A.105/Cry2Ab2. Dessa forma os parasitoides não conseguiram completar o ciclo larval, que dura cerca de 10 dias, antes da morte do hospedeiro. Esses híbridos causam elevado controle de *S. frugiperda* (Aguirre et al. 2015; Burtet et al. 2017; Chattopadhyay e Banerjee, 2018), que é hospedeiro de várias espécies de parasitoides, conferindo assim uma desvantagem das plantas Bt aos parasitoides, pois pode reduzir a disponibilidade de hospedeiros aos parasitoides no campo ou causarem a morte do hospedeiro durante o desenvolvimento do parasitoide (O'Callaghan et al, 2005, Pilcher et al, 2005). Contudo, o uso de áreas de refúgio e o uso de inseticidas seletivos garantem a presença de hospedeiros, evitando a redução na população de parasitoides (Pilcher et al, 2005).

A duração do período larval de *C. sonorensis* em lagartas de *S. frugiperda* no tratamento controle foi de 10,7 dias em média para a fase larval, de 6,6 dias na fase de pupa e longevidade de 12,8 dias, semelhante ao observado por Isenhour (1986) para *C. sonorensis* em lagartas de *S. frugiperda* a 25°C. No entanto, os híbridos Bt apresentaram efeitos subletais no desenvolvimento e reprodução de *C. sonorensis*, evidenciados pelo prolongamento dos períodos larval e pupal e a redução

do peso das pupas e fecundidade de *C. sonorensis*. Sanders et al. (2007) também observaram efeitos subletais nos adultos de *C. sonorensis* provenientes de *S. frugiperda* alimentados com milho Bt expressando Cry1Ab, os quais foram 16% mais leves e tiveram o tamanho da tíbia menor quando comparados aos hospedeiros que consumiram o milho convencional. Os efeitos subletais observados no parasitoide, devido à qualidade do hospedeiro alimentado com plantas Bt, podem afetar a capacidade de parasitismo dos indivíduos que sobrevivem, prejudicando a sua atuação no ecossistema (Bostanian e Akalach, 2004; He et al. 2012; Biondi et al. 2013), ou causando a extinção local, uma vez que os efeitos subletais afetam também a capacidade reprodutiva dos sobreviventes (Desneux et al. 2007; Banks et al. 2011). Porém estudos futuros devem ser realizados para avaliar se esses efeitos subletais afetam o parasitoide em condições de campo.

As proteínas Bt afetam herbívoros alvo, tornando-os hospedeiros nutricionalmente inferiores ou inadequados para os inimigos naturais, uma vez que essas proteínas alteram a condição de íons e aminoácidos na hemolinfa do hospedeiro (Dhillon e Sharma, 2010; Salles et al. 2015; Wang et al. 2017). Além disso, o nível de lesão causado pelo parasitoide em seu hospedeiro depende da biologia do parasitoide (Vojtech et al. 2005). Por exemplo, *C. sonorensis* consome todo interior do corpo de seu hospedeiro (Wilson e Ridgeway, 1975; Harvey e Strand, 2002), e provavelmente tem maior exposição às toxinas Bt, enquanto que *Cotesia marginiventris* (Cresson) alimenta-se apenas de uma parte do corpo do hospedeiro (Jalali et al. 1987) e, segundo Tian et al. (2014), não sofreram efeitos adversos da proteína Cry1F. Essas espécies de parasitoides que se alimentam de apenas uma pequena porção do corpo do hospedeiro, possivelmente não entram em contato com as proteínas Bt presentes nos tecidos do hospedeiro ou os efeitos da proteína Bt não afetam a qualidade do hospedeiro durante o desenvolvimento do parasitoide, permitindo a sua emergência.

O uso de plantas Bt causou uma redução no uso de inseticidas principalmente os de largo espectro (Wolfenbarger e Phifer 2000). Embora existam efeitos negativos do milho Bt no desenvolvimento e na reprodução de *C. sonorensis*, esses resultados são significativamente menores do que aqueles provocados por inseticidas químicos (Baur e Boethel 2003, O'Callaghan et al, 2005).

Dessa forma as plantas Bt conferem benefícios à manutenção e ao aumento da biodiversidade de inimigos naturais nos agroecossistemas. A riqueza de insetos benéficos converte-se em benefícios para o próprio agroecossistema, uma vez que controlam o aumento das pragas secundárias e de pragas resistentes (Tomich et al., 2011). Contudo, essas vantagens devem ser consideradas de acordo com um programa de manejo integrado de pragas com o uso de refúgio e produtos seletivos (Romeis et al. 2006).

Parasitoides generalistas, como *C. sonorensis*, podem parasitar larvas de 27 espécies de lepidópteros (Lingren et al. 1970), possuem a vantagem de sobreviver no agroecossistema quando o ambiente ou hospedeiro são desfavoráveis, em relação aos parasitoides especialistas. O milho transgênico Bt constitui uma barreira ao desenvolvimento das larvas de parasitoides (Hansen et al. 2013), corroborando com os resultados de nosso estudo para YieldGard VTPRO.

Para verificar se efeitos negativos resultantes de nosso experimento são devido à qualidade do hospedeiro ou pela ingestão das proteínas Bt presentes no corpo do hospedeiro, devem ser realizados estudos com hospedeiros resistentes, para *C. sonorensis*, visto que os dados da literatura mostram que não existe efeito nos parasitoides, quando testados em hospedeiros resistentes (Tian et al. 2014; Shelton et al. 2016; Romeis et al. 2018).

Além disso deve-se testar a hipótese da relação de efeitos negativos das plantas Bt maior em parasitoides que se alimentam de todo o corpo do hospedeiro, comparando com espécies de parasitoides larvais que consomem apenas uma pequena porção do hospedeiro e analisar se ocorre o sequestro das proteínas Bt por parasitoides.

5. Referências Bibliográficas

- Aguirre, L. A., Hernández, A., Flores, M., Pérez-Zubiri, R., Cerna, E., Landeros, J., & Frías, G. A. (2015). Comparison of the level of damage by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on genetically-modified and conventional maize plants in northern Mexico. *Southwestern Entomologist*, 40(1), 171-178.

- Altieri, M. A. (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. In *Invertebrate Biodiversity as Bioindicators of Sustainable Landscapes*, pp. 19-31.
- Banks, J. E., Stark, J. D., Vargas, R. I., & Ackleh, A. S. (2011). Parasitoids and ecological risk assessment: Can toxicity data developed for one species be used to protect an entire guild?. *Biological Control*, 59(3), 336-339.
- Bartón, K. (2014). MuMIn: Multi-model inference. R package version 1.10.5.
- Baur, M. E., & Boethel, D. J. (2003). Effect of Bt-cotton expressing Cry1A (c) on the survival and fecundity of two hymenopteran parasitoids (Braconidae, Encyrtidae) in the laboratory. *Biological Control*, 26(3), 325-332.
- Betz, F. S., Hammond, B. G., & Fuchs, R. L. (2000). Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32(2), 156-173.
- Biondi, A., Zappalà, L., Stark, J. D., & Desneux, N. (2013). Do biopesticides affect the demographic traits of a parasitoid wasp and its biocontrol services through sublethal effects?. *PLoS One*, 8(9), e76548.
- Blanco, C., Chiaravalle, W., Dalla-Rizza, M., Farias, J., García-Degano, M., Gastaminza, G., ... Willink, E. (2016). Current situation of pests targeted by Bt crops in Latin America. *Current Opinion in Insect Science*, 15: 131–138.
- Bostanian, N. J., & Akalach, M. (2004). The contact toxicity of indoxacarb and five other insecticides to *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) and *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Braconidae), beneficials used in the greenhouse industry. *Pest Management Science*, 60(12), 1231-1236.

- Burtet, L. M., Bernardi, O., Melo, A. A., Pes, M. P., Strahl, T. T., & Guedes, J. V. (2017). Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil. *Pest management science*, 73(12), 2569-2577.
- Cattaneo, M. G., Yafuso, C., Schmidt, C., Huang, C. -y., Rahman, M., Olson, C., ... & Carriere, Y. (2006). Farm-scale evaluation of the impacts of transgenic cotton on biodiversity, pesticide use, and yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(20), 7571-7576.
- Chattopadhyay, P., & Banerjee, G. (2018). Recent advancement on chemical arsenal of Bt toxin and its application in pest management system in agricultural field. *3 Biotech*, 8(4), 201.
- Chen, M., Zhao, J. Z., Collins, H. L., Earle, E. D., Cao, J., & Shelton, A. M. (2008). A Critical assessment of the effects of Bt transgenic plants on parasitoids. *PLoS ONE* 3(5): e2284.
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52(1), 81-106.
- Dhillon, M. K., & Sharma, H. C. (2010). Chickpea-mediated effects of *Bacillus thuringiensis* on *Helicoverpa armigera* and its larval parasitoid, *Campoletis chloridae*. *Journal of Applied Entomology*, 134(9-10), 682-693.
- Elzen, G. W., Williams, H. J., & Vinson, S. B. (1983). Response by the parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) to chemicals (synomones) in plants: implications for host habitat location. *Environmental Entomology*, 12(6), 1873-1877.
- Frizzas, M. R., & Oliveira, C. M. (2006). Plantas transgênicas resistentes a insetos e organismos não-alvo: Predadores, parasitóides e polinizadores. *Universitas: Ciências da Saúde* 4(1), 63–82.
- Guo, J., He, K., Hellmich, R. L., Bai, S., Zhang, T., Liu, Y., Ahmed, T., Wang, Z. (2016). Field trials to evaluate the effects of transgenic cry1Ie maize on the community characteristics of arthropod natural enemies. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep22102

- Hansen, L. S., Lövei, G. L., & Székács, A. (2013). Survival and development of a stored-product pest, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), and its natural enemy, the parasitoid *Lariophagus distinguendus* (Hymenoptera: Pteromalidae), on transgenic Bt maize. *Pest Management Science*, 69(5), 602-606.
- Harvey, J.A., Strand, M.R., (2002). The development strategies of endoparasitoid wasps vary with host feeding ecology. *Ecology* 83 (9), 2439–2451.
- He, Y., Zhao, J., Zheng, Y., Desneux, N., & Wu, K. (2012). Lethal effect of imidacloprid on the coccinellid predator *Serangium japonicum* and sublethal effects on predator voracity and on functional response to the whitefly *Bemisia tabaci*. *Ecotoxicology*, 21(5), 1291-1300.
- Isenhour, D. J. (1986). Developmental time, adult reproductive capability, and longevity of *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) as a parasitoid of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 79(6), 893-897.
- Jalali, S. K., Singh, S. P., and Ballal, C. R. (1987) Studies on host age preference and biology of exotic parasite, *Cotesia marginiventris* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae). *Entomon* 12(1), 59–62.
- James, C. (2017) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years. Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações Agro-Biotecnológicas (ISAAA), nº53, p.153.
- Kasten Jr., P., Precetti, A. A. C. M., & Parra, J. R. P. (1978). Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* em duas dietas artificiais e substrato natural. *Revista de Agricultura*, 53(1), 68-78.

- Lingren, P. D., Guerra, R. J., Nickelsen, J. W., & White, C. (1970). Hosts and host-age preference of *Campoletis perdistinctus*. *Journal of Economic Entomology*, 63(2), 518-522.
- O'Callaghan, M., Glare, T. R., Burgess, E. P. J., & Malone, L. A. (2005). Effects of plants genetically modified for Insect Resistance on nontarget organisms. *Annual Review of Entomology*, 50(1), 271–292.
- Pilcher, C.D., Rice, M.E. & Obrycki, J.J. (2005). Impact of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn and crop phenology on five non-target arthropods. *Environmental Entomology*. 34(5), 1302–1316.
- R Development Core Team. (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Resende, D. C., Mendes, S. M., Marucci, R. C., de Carvalho Silva, A., Campanha, M. M., & Waquil, J. M. (2016). Does Bt maize cultivation affect the non-target insect community in the agro ecosystem?. *Revista Brasileira de Entomologia*, 60(1), 82-93.
- Ritchie, S. W., Hanway, J. J., & Benson, G. O. (1993). How a corn plant develops. Ames, Iowa State University of Science and Technology, 26p.
- Romeis, J., Meissle, M., & Bigler, F. (2006). Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature biotechnology*, 24(1), 63.
- Romeis, J., Naranjo, S. E., Meissle, M., & Shelton, A. M. (2018). Genetically engineered crops help support conservation biological control. *Biological Control*, doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.10.001

- Salles, S. M. D., Pinto, L. M. N., Pavani, F., Machado, V., & Fiuza, L. M. (2015). Interactions between *Bacillus thuringiensis* proteins, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Campoletis flavicincta* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Bt Research*, 6(5), 1-10.
- Sanders, C. J., Pell, J. K., Poppy, G. M., Raybould, A., Garcia-Alonso, M., & Schuler, T. H. (2007). Host-plant mediated effects of transgenic maize on the insect parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Biological Control*, 40(3), 362-369.
- Schuler, T. H., Denholm, I., Clark, S. J., Stewart, C. N., & Poppy, G. M. (2004). Effects of Bt plants on the development and survival of the parasitoid *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) in susceptible and Bt-resistant larvae of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Insect Physiol.* 50: 435–443.
- Schuler, T.H., Potting, R.P.J., Denholm, I., Clark, S.J., Clark, A.J., Stewart, C.N. & Poppy, G.M. (2003). Tritrophic choice experiments with *Bt* plants, the diamondback moth (*Plutella xylostella*) and the parasitoid *Cotesia plutellae*. *Transgenic Res.* 12: 351–361.
- Shelton, A. M., Romeis, J., Naranjo, S. E., Tian, J. C., & Hellmich, R. L. (2016). Use of Bt-resistant caterpillars to assess the effect of Cry proteins on beneficial natural enemies. *IOBC-WPRS Bulletin*, 114, 51-55.
- Therneau, T. A (2014). Package for Survival Analysis in S. R package version 2.37-7.
- Tian, J. C., Wang, X. P., Long, L. P., Romeis, J., Naranjo, S. E., Hellmich, R. L., & Shelton, A. M. (2014). Eliminating host-mediated effects demonstrates Bt maize producing Cry1F has no adverse effects on the parasitoid *Cotesia marginiventris*. *Transgenic Research*, 23(2), 257-264.
- Tomich, T. P., Brodt, S., Ferris, H., Galt, R., Horwath, W. R., Kebreab, E., ... & Michelsmore, R. (2011). Agroecology: a review from a global-change perspective. *Annual Review of Environment and Resources*, 36(1), 193-222.

- Vojtech, E., Meissle, M. & Poppy, G.M. (2005). Effects of Bt maize on the herbivore *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) and the parasitoid *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae). *Transgenic Research*, 14(2), 133–144.
- Wang, Z. X., Li, Y. H., He, K. L., Bai, S. X., Zhang, T. T., Cai, W. Z., & Wang, Z. Y. (2017). Does Bt maize expressing Cry1Ac protein have adverse effects on the parasitoid *Macrocentrus cingulum* (Hymenoptera: Braconidae)?. *Insect Science*, 24(4), 599-612.
- Wilson, D.D., & Ridgeway, R.L., (1975). Morphology, development and behaviour of the immature stages of the parasitoid, *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 68(2), 191–196.
- Wolfenbarger, L. L., & Phifer, P. R. (2000). The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science*, 290(5499), 2088-2093.

Capítulo 4: Efeito de híbridos de milho Cry sobre a sobrevivência, desenvolvimento e reprodução do predador *Euborellia annulipes* (Lucas, 1847) (Dermaptera: Anisolabididae)

Resumo

Euborellia annulipes é um predador onívoro que, entre outras presas, se alimenta da lagarta do milho, *Spodoptera frugiperda* e de material vegetal, como pólen. Avaliamos os efeitos de híbridos de milho Bt a *S. frugiperda* no desenvolvimento, reprodução e sobrevivência de *E. annulipes*, através do consumo de lagartas (dieta à base de presas) e da ingestão conjunta de lagartas e pólen (dieta mista). Utilizaram-se os híbridos Bt YieldGard, YieldGard VTPRO e, comparando-os a um híbrido não Bt. A sobrevivência de ninfas e adultos de *E. annulipes* não foi afetada pelos híbridos Bt, quando estes foram alimentados apenas com presas. No entanto, quando a alimentação foi à base de dieta mista a sobrevivência das ninfas e adultos de *E. annulipes* foi menor nos dois híbridos transgênicos. O tempo de desenvolvimento das ninfas do predador foi mais longo em todos os tratamentos com plantas Bt, em comparação com o controle. A longevidade dos adultos, até o período avaliado, foi menor nos dois híbridos transgênicos, em relação ao controle, apenas na dieta mista. Indivíduos que se alimentaram de lagartas e pólen Bt produziram menor número de ovos do que o tratamento controle, porém a viabilidade dos ovos não foi estatisticamente diferente nos híbridos Bt e controle, nas duas dietas avaliadas. As plantas Bt afetaram negativamente o predador *E. annulipes*, principalmente através da dieta mista, comprometendo a cadeia trófica no sistema agrícola.

Palavras-chave: milho Bt, presa, pólen, tesourinha

Effect of maize hybrids Cry on the survival, development and reproduction of the predator

Euborellia annulipes (Lucas, 1847) (Dermaptera: Anisolabididae)

Abstract

Euborellia annulipes is an omnivorous predator that, among other preys, feeds on the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and plant material, such as pollen. We evaluated the effects of Bt maize hybrids on *S. frugiperda* on the development, reproduction and survival of *E. annulipes* through the consumption of caterpillars (prey diet) and the combined intake of caterpillars and pollen (mixed diet). Bt YieldGard and YieldGard VTPRO hybrids were used and compared to a non-Bt hybrid. The survival of nymphs and adults of *E. annulipes* was not affected by the Bt hybrids when fed only on preys. However, when feeding on the mixed diet, the survival of nymphs and adult was lower in the two transgenic hybrids. The development time of *E. annulipes* nymphs was longer in all treatments with Bt plants compared to the control. The longevity of the adults during the evaluated period was lower in the two transgenic hybrids in relation to the control, only in the mixed diet. Females fed on caterpillars and Bt pollen produced fewer eggs than the control treatment, but egg viability was not statistically different in Bt and control hybrids in the two diets evaluated. Bt plants negatively affected *E. annulipes*, mainly through the mixed diet, compromising the trophic chain in the maize ecosystem.

Key-words: corn, Bt plants, pollen, earwigs

1. Introdução

A tesourinha *Euborellia annulipes* (Lucas) (Dermaptera: Anisolabididae) é uma espécie cosmopolita (Kocarek et al. 2015) de hábito onívoro, generalista (Klostermeyer, 1942, Lemos et al. 2003) e apresenta potencial para ser usada em programas de manejo integrado de pragas (Lemos et al. 2003). Este predador é eficiente no controle de pragas das famílias Curculionidae e Noctuidae (Klostermeyer, 1942; Koppenhofer, 1995; Lemos et al. 2003; Silva et al. 2009). Dentre os noctuídeos,

E. annulipes se destaca no controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (Silva et al. 2009), a principal praga do milho nas Américas (Clark et al. 2007; Vilarinho et al. 2011).

Inseticidas de amplo espectro utilizados para o controle de *S. frugiperda* afetam negativamente predadores e parasitoides (Cloyd e Bethke, 2011), comprometendo a mortalidade da praga por agentes de controle biológico. Com a adoção pelos agricultores das cultivares transgênicas que expressam proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis* (Bravo et al. 2007), os inimigos naturais podem encontrar melhores condições para sobreviver nos agroecossistemas, devido à redução no uso de inseticidas (Betz et al. 2000; Shelton et al. 2002). Entretanto, existem evidências de que plantas Bt podem afetar negativamente a sobrevivência de inimigos naturais (Lövei e Arpaia, 2005; Naranjo, 2009; Leite et al. 2014).

Existem duas vias de exposição das toxinas Bt aos organismos não-alvo dentro das cadeias tróficas dos sistemas agrícolas (Romeis et al. 2008), seja pela alimentação em néctar e pólen das plantas transgênicas, seja pela transferência de toxinas Bt para níveis tróficos superiores através dos hospedeiros ou presas (Andow et al. 2006; Romeis et al. 2006). Qualquer alteração na dieta alimentar do segundo nível trófico resultará na perturbação do equilíbrio entre os demais níveis, afetando negativamente os predadores e parasitoides (Lawo et al. 2010).

Nos últimos 20 anos, diversos estudos foram realizados em laboratório e campo para avaliar o efeito de milho transgênico em inimigos naturais (Lövei e Arpaia, 2005; Hansen et al. 2013; Tian et al. 2014; Ali et al. 2018). No entanto, os resultados são divergentes; alguns trabalhos apontam a inexistência de efeitos sobre parasitoides e predadores (Pilcher et al. 1997; Al-Deeb et al. 2001; Lundgren & Wiedenmann, 2002), enquanto outros revelam efeitos negativos no desenvolvimento, sobrevivência e reprodução de inimigos naturais (Hilbeck et al. 1998; Losey et al. 1999; Jesse e Obrycki 2000; Zwahlen et al. 2003).

Até o momento, os experimentos realizados a fim de compreender os efeitos de plantas Bt, envolveram espécies de predadores das Ordens Heteroptera, Neuroptera e Coleoptera (Wolfenbarger et al. 2008, Naranjo, 2009, Shelton et al. 2016) e apenas o trabalho de Frizzas et al. (2014) avaliou o

efeito de milho Bt sobre o predador *Doru luteipes* (Scudder) (Dermaptera: Forficulidae) em campo. Devido à carência de pesquisas sobre o efeito de plantas Bt a tesourinhas, nosso objetivo foi avaliar os efeitos de três híbridos de milho Bt na biologia de *E. annulipes*, através de uma dieta exclusivamente com lagartas de *S. frugiperda* e outra mista, contendo presa e pólen dos híbridos de milho avaliados.

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal e coleta de pólen

Foram utilizados os híbridos de milho Bt 30K75Y YieldGard (Cry1Ab) e BM780Pro YieldGard VTPRO (Cry1A.105/Cry2Ab2) e o híbrido não-transgênico BM207 (controle). Estes foram semeados em campo, semanalmente, a fim de garantir folhas frescas ao longo do experimento.

As coletas de pólen do milho foram realizadas durante os estágios VT e R1 (Hellmich et al. 2001; Peterson et al. 2016). Quando as anteras começaram a liberar o pólen, aproximadamente 20 pendões de cada híbrido foram ensacados, com sacos de papel Kraft (19x28cm), por 12 horas. Após este período os sacos, ainda no pendão, foram invertidos, agitados para liberar o pólen e retirados da planta (Peterson et al. 2016). Depois da coleta, o pólen foi peneirado em peneira com malha de 0,16mm para remover insetos, anteras e outros detritos. O pólen peneirado foi armazenado em refrigerador à $0^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C durante o período dos bioensaios.

2.2. Insetos

As colônias de *S. frugiperda* e *E. annulipes* foram iniciadas a partir de coletas em lavoura de milho (Cry1A.105 /Cry2Ab2 e Cry1Ab) de março a junho de 2016 e 2017 em Nortelândia ($56^{\circ}49'44.741''$ W e $14^{\circ}9'6.923''$ S), Mato Grosso, Brasil. A criação das lagartas foi conduzida em laboratório com dieta artificial seguindo metodologia de Kasten et al. (1978). As pupas eram retiradas e colocadas em potes plásticos de 500 ml até a emergência dos adultos. Estes foram criados em gaiolas de PVC, de 20 cm de diâmetro x 25 cm de altura, revestidas com papel tipo sulfite; a parte superior

foi tampada com tecido do tipo TNT e o fundo com uma bandeja revestida com papel toalha. O alimento para os adultos consistiu de uma solução de mel a 10%, embebido em algodão hidrófilo e outro embebido com água.

Ninfas e adultos de *E. annulipes* foram criadas em potes de 100 ml contendo 0,300 g de dieta artificial (Lemos, 1997) e um pedaço de papel absorvente (46 x 10 cm) dobrado em quatro partes (5,5 x 10 cm) e umedecido com água (9 ml), como refúgio e substrato para oviposição. O alimento foi substituído e o papel umedecido (2 ml), a cada dois dias. O papel foi trocado a cada semana; no entanto, quando havia posturas nos recipientes, a troca do papel foi realizada somente quando os ovos estavam em estágio avançado de desenvolvimento, de modo que o ninho não fosse alterado, causando menos estresse e evitando o canibalismo dos ovos pela fêmea (Lemos et al. 1998). As ninfas eclodidas permaneciam nos três primeiros dias de vida junto com a fêmea, a fim de garantir o comportamento de alimentação materna (Vancassel 1984; Koelliker e Vancassel 2007).

Os insetos foram criados e os experimentos realizados em sala climatizada a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 70% de umidade relativa e fotoperíodo 14:10 h (L:D).

2.3. Efeito do milho Bt sobre o desenvolvimento e reprodução de *E. annulipes* por meio de uma dieta à base de presas

O efeito do milho Bt sobre o predador foi investigado por meio da oferta de lagartas de *S. frugiperda* à *E. annulipes*. Ninfas de três dias de idade foram individualizadas em potes de 100 ml contendo papel absorvente umedecido, como descrito acima, lagartas de *S. frugiperda* e um pedaço (aproximadamente 7cm x 4cm) de folha de milho (entre os estágios V4 e V6). O fornecimento de lagartas de *S. frugiperda* a *E. annulipes* foi realizado segundo Silva et al. (2009). Inicialmente foram fornecidas duas lagartas de 2º instar para as ninfas de 1º instar, e a partir do 4º instar foram ofertadas oito lagartas de 3º instar. Aumentou-se gradativamente a oferta de lagartas de acordo com o consumo das tesourinhas ao longo do desenvolvimento. Foram utilizadas 43, 43 e 44 ninfas, para os híbridos controle, YieldGard e YieldGard VTPRO, respectivamente.

Quando as ninfas atingiram a fase adulta formaram-se 20 casais para cada tratamento, alimentados com lagartas de terceiro instar em folhas de milho. Cada tratamento na sua respectiva dieta Bt e controle. Para verificar a viabilidade dos ovos, quando constatada postura, foi interrompido o fornecimento de lagartas e os casais de *E. annulipes* foram alimentados com dieta artificial por aproximadamente 10 dias, como descrito na secção anterior, uma vez que as lagartas de *S. frugiperda* poderiam preda os ovos do predador, causar estresse às fêmeas ou canibalismo pela fêmea (Rankin et al.1996). As lagartas e as folhas foram substituídas diariamente. O papel umedecido foi trocado como descrito na secção anterior, assim como a dieta artificial quando foi necessário utilizá-la. A fase adulta do predador foi avaliada por quatro meses, simulando o ciclo da cultura.

2.4. Efeito do milho Bt sobre o desenvolvimento e reprodução de *E. annulipes* por meio de uma dieta mista

Para avaliar o efeito dos híbridos Bt sobre *E. annulipes*, por meio de uma dieta mista, as tesourinhas foram alimentadas com lagartas de *S. frugiperda*, como descrito na secção anterior, e aproximadamente 0,051g de pólen de cada híbrido em cada tratamento, visto que o uso do pólen do milho por si só não é suficiente para o desenvolvimento de tesourinha (Pasini et al. 2007). O pólen e as lagartas foram substituídos diariamente. Neste ensaio foram utilizadas 44, 51, 56 repetições para os híbridos controle, YieldGard e YieldGard VTPRO, respectivamente. Formaram-se 20 casais para cada tratamento. Quando as fêmeas estavam com postura, foi oferecido pólen e dieta artificial, pelos motivos citados anteriormente. A fase adulta foi avaliada por quatro meses.

2.5. Análise estatística

Foram avaliados o tempo de desenvolvimento ninfal, sobrevivência, longevidade, fecundidade e viabilidade dos ovos. Os resultados da mortalidade e proporção de ovos férteis foram analisados por meio do modelo linear generalizado (GLM) sob distribuição de quasibinomial, e os resultados de desenvolvimento e fecundidade foram analisados por GLM sob distribuição de Poisson no Sistema Estatístico R. Quando constatada diferença significativa ($p < 0,05$) entre modelo nulo e o modelo de

interesse, foi realizada a comparação entre os tratamentos por meio da análise dos contrastes do modelo de interesse.

3. Resultados

3.1. Efeito do consumo de lagartas criadas em milho Bt sobre o desenvolvimento e reprodução de *E. annulipes*

A sobrevivência de ninfas de *E. annulipes* não foi afetada pela ingestão de lagartas que se alimentaram dos híbridos contendo as diferentes proteínas Bt ($X^2_{(3.166)}=169.63$, $p=0.865$), sendo que aproximadamente 90% das ninfas completaram o ciclo e chegaram à fase adulta. Houve prolongamento no tempo de desenvolvimento das ninfas criadas com presas que ingeriram folhas do híbrido Bt em relação ao controle ($F_{(3.101)}=7.10$, $p<0.05$) (Tabela 1). A mortalidade ($X^2_{(3.155)}=259.80$, $p=0.62$) e a longevidade durante os quatro meses de acompanhamento da fase adulta não foram estatisticamente diferentes entre os tratamentos ($F_{(3.156)}=0.5901$, $p=0.6224$) (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros biológicos de *Euborellia annulipes* predando lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com milho Bt e não-transgênico.

Parâmetros		Tratamento		
		Controle	YieldGard VTPRO (Cry1A.105/Cry2Ab2)	YieldGard (Cry1Ab)
Instar (dias)	1º (dias) ^{ns}	11,95±0,30 n=40	12,53±0,32 n=43	12,62±0,32 n=42
	2º (dias) ^{ns}	10,35±0,30 n=40	11,00±0,26 n=40	10,60±0,17 n=40
	3º (dias) ^{ns}	11,55±0,42 n=40	11,50±0,44 n=40	11,07±0,27 n=40
	4º (dias) ^{ns}	12,20±0,50 n=40	13,92±0,86 n=40	12,52±0,63 n=40
	5º (dias)	16,61±0,81 n=31	18,50±0,91 n=32	16,71±0,80 n=35
Tempo ninfa (dias) ^{ns}		58,92±1,30c n=40	63,85±1,31a n=40	60,65±0,93b n=40
Mortalidade ninfas (%) ^{ns}		4,76 n=43	6,98 n=44	4,76 n=43
Longevidade (dias) ^{ns}		119,52±1,47 n=40	117,27±2,06 n=40	119,97±1,83 n=40
Mortalidade Adultos (%) ^{ns}		7,5 n=40	12,5 n=40	7,5 n=40

Médias (\pm Erro padrão) seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem estatisticamente pelo modelo linear generalizado a 0,05% de significância. ^{ns} não houve diferença estatística entre os tratamentos.

O número de ovos depositados ($F_{(3.76)} = 0.1793$, $p=0.9101$) (Figura 1a) e a viabilidade dos ovos ($F_{(3.75)} = 0.413$, $p= 0.7441$) de *E. annulipes* (Figura 1b) nos híbridos Bt não foram diferentes estatisticamente em relação ao controle.

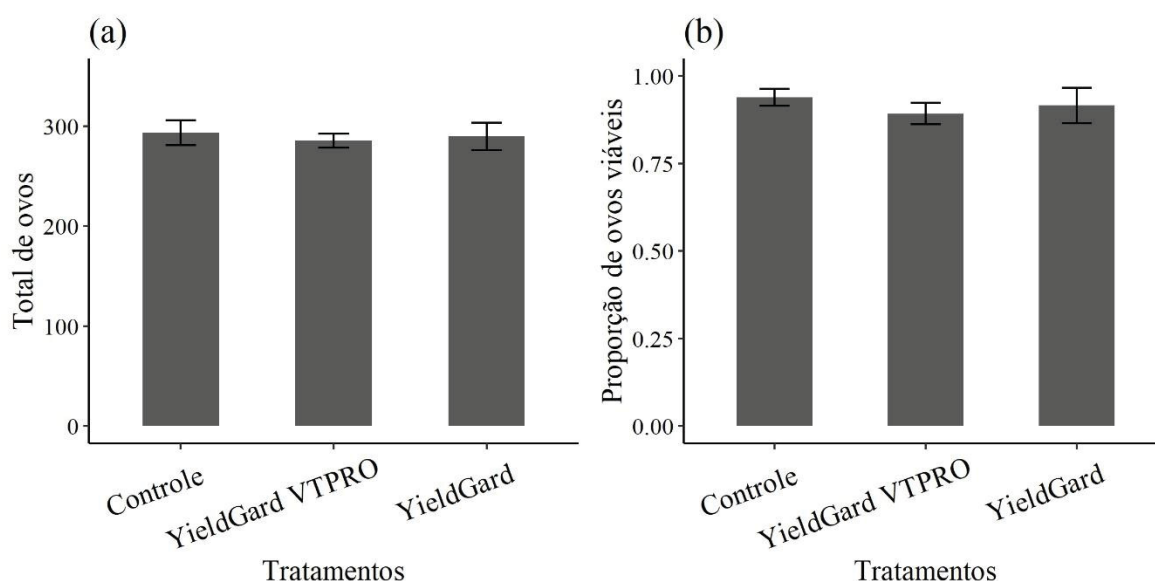


Figura 1. Efeito de presas provenientes de híbridos Bt no número de ovos produzidos (a) e no número de ovos viáveis (b) de *Euborellia annulipes*.

3.2. Efeito do consumo de lagartas e pólen de milho Bt sobre o desenvolvimento e reprodução de *E. annulipes*

A sobrevivência das ninfas foi menor na dieta composta por lagartas alimentadas com híbrido e pólen de milho YieldGard e YieldGard VTPRO ($P_{(3.208)}=4.45$, $p<0.05$). A duração dos instares de *E. annulipes* aumentou na dieta mista nos híbridos Bt em relação ao controle (Tabela 2), com exceção do 2º instar ($F_{(3.171)} = 1.1893$, $p=0.3154$). O estágio ninfal foi 17,10% mais longo em YieldGard VTPRO, em relação ao controle. No híbrido YieldGard, o desenvolvimento foi 7,02% mais longo em relação ao controle, mas nesse híbrido o tempo de desenvolvimento foi aproximadamente 9% mais rápido em relação ao outro híbrido ($F_{(3.156)} = 45.516$, $p<0.05$). Houve maior mortalidade de adultos

de *E. annulipes*, criados na dieta mista, provenientes dos híbridos Bt, em relação ao controle ($P_{(3,156)}=5.48$, $p<0.05$). A longevidade durante o período analisado foi menor nos híbridos Bt do que no controle ($F_{(3,156)}= 6.1279$, $p<0.05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros biológicos de *Euborellia annulipes* se alimentando de lagartas e pólen de milho Bt e não-transgênico.

		Tratamento		
Parâmetros		Controle	YieldGard VTPRO (Cry1A.105/Cry2Ab2)	YieldGard (Cry1Ab)
Instar (dias)	1º (dias)	12,07±0,20b n=42	13,83±0,30a n=54	13,75±0,30a n=44
	2º (dias) ^{ns}	11,27±0,30 n=41	11,68±0,20 n=45	11,68±0,27 n=41
	3º (dias)	11,80±0,30b n=41	13,44±0,42a n=41	12,92±0,36a n=40
	4º (dias)	12,9±0,40b n=40	14,97±0,50a n=40	13,55±0,42b n=40
	5º (dias)	14,07±0,50c n=27	18,89±0,53a n=29	16,30±0,43b n=24
Tempo ninfa (dias)		57,37±0,90c n=40	67,17±1,14a n=40	61,4±1,10b n=40
Mortalidade ninfas (%)		6,98b n=43	28,57a n=56	21,57a n=51
Longevidade (dias)		116,50±2,41a n=40	100,27±5,35b n=40	106,42±4,62b n=40
Mortalidade Adultos (%)		10b n=40	40a n=40	40a n=40

Médias (± Erro padrão) seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo modelo linear generalizado a 0,05% de significância. ^{ns} não houve diferença estatística entre os tratamentos.

O número de ovos ($F_{(3,76)}= 11.246$, $p<0.05$) foi 55% em YieldGard VTPRO e 36,51% no híbrido YieldGard (Figura 2a) em relação ao controle. Contudo não foi observada diferença estatística para a proporção de ovos férteis de *E. annulipes* alimentada com dieta mista nos híbridos Bt se comparada ao controle ($F_{(3,68)}= 0.83$, $p= 0.48$) (Figura 2b).

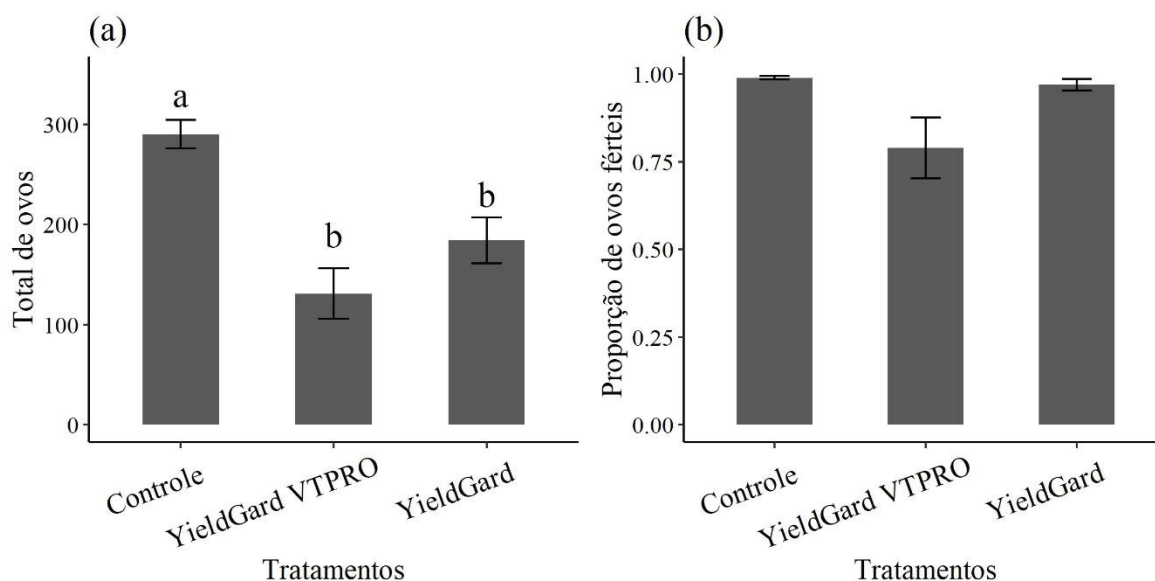


Figura 2. Efeito da dieta mista no número de ovos produzidos (a) e de ovos viáveis (b) de *Euborellia annulipes*.

4. Discussão

A sobrevivência de *E. annulipes* não foi afetada pelos híbridos Bt por meio da dieta à base de lagartas de *S. frugiperda*. Resultados semelhantes foram observados por Tian et al. (2014) para *Geocoris punctipes* (Say) (Hemiptera: Geocoridae) e *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae), quando consumiram lagartas resistentes de *S. frugiperda* alimentadas com milho Cry1F e de *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) em algodão Cry1Ac/Cry2Ab. No entanto, na dieta composta por pólen e lagartas, a sobrevivência das ninfas e dos adultos de *E. annulipes* foi menor nos híbridos Bt, principalmente no tratamento YieldGard VTPRO. Bai et al. (2005) não observaram efeitos na sobrevivência de *Propylea japonica* (Thunberg) (Coleoptera: Coccinellidae), quando alimentada com pólen e pulgão *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) em arroz Bt expressando a proteína Cry1Ab.

O tempo de desenvolvimento das ninfas no tratamento controle variou de 57,37 dias na dieta mista até 58,92 dias nas ninfas alimentadas apenas com lagartas, tal como observado por Silva et al. (2009), que registraram tempo médio de desenvolvimento de 57,2 dias para *E. annulipes* quando alimentada com lagartas de *S. frugiperda* à 25°C. Contudo, em nosso estudo ocorreu o prolongamento

do desenvolvimento das ninfas nos três híbridos Bt em relação ao híbrido não-Bt, nas duas dietas testadas. Outros estudos mostraram resultados semelhantes para *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada com *Rhopalosiphum padidi* (Linnaeus) (Homoptera: Aphididae) ou *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari: Tetranychidae), na presença de Cry1Ab (Dutton et al. 2002) e *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) alimentada com *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), proveniente de dieta contendo Cry1F (Paula et al. 2015). Porém, há relatos em que pólen de plantas Bt não interferiram no desenvolvimento de inimigos naturais e insetos não-alvo (Wang et al. 2007), como para *Trichogramma ostrinae* (Pang e Chen) (Hymenoptera Trichogrammatidae) alimentados com pólen de milho Cry1Ab; para larvas de *P. japonica* em dieta de pólen/afídeos contendo Cry1Ac; Cry1Ab; Cry1F (Zhang et al. 2014); e para *Apis mellifera* (Linnaeus) (Hymenoptera: Apidae) e *Bombyx mori* (Linnaeus) alimentados com pólen de algodão Cry1Ac/EPSPS e Cry1Ac/Cry2Ab (Niu et al. 2013). Tais resultados podem divergir em relação às espécies, conforme as revisões de Duan et al. (2008) e Han et al. (2016) a respeito de plantas Bt sobre organismos não-alvo.

A fecundidade de fêmeas de *E. annulipes* alimentadas com pólen e lagartas foi menor nos três híbridos Bt em relação ao controle, embora, na dieta apenas de lagartas, não foi observada diferença entre os híbridos Bt e o controle. A viabilidade dos ovos não foi estatisticamente diferente entre os híbridos Bt e o controle em ambos os ensaios. Ferry et al. (2006) não observaram efeitos negativos da proteína Cry1Ac na quantidade de ovos produzidos pelo predador *Pterostichus madidus* (Fabricius) (Coleoptera: Carabidae) alimentando-se de larvas de *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae). Tian et al. (2013) não observaram redução na capacidade reprodutiva e nem na viabilidade dos ovos de *Chrysoperla rufilabris* (Burmeister) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentadas com lagartas de *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) em brócolis expressando Cry1Ac e algodão Cry1Ac/Cry2Ab e *S. frugiperda* em milho Cry1F.

Os predadores onívoros podem utilizar pólen e néctar como alimento alternativo quando a disponibilidade de presas é escassa, garantindo a sua sobrevivência na cultura ou na paisagem

marginal às áreas agrícolas, prevenindo o surto de pragas (Coll e Guershon, 2002), ou como um suplemento regular para sua dieta alimentar (Lundgren, 2009; Roulston e Cane, 2000; Simpson et al. 2015; Schuldiner-Harpaz e Coll, 2017). O consumo de pólen como suplementação alimentar está presente entre os predadores coccinelídeos e dermápteros (Nonino et al. 2007; Pasini et al. 2007; Schuldiner-Harpaz e Coll, 2017; Tomé, 2018). Assim, esses predadores podem ser mais suscetíveis aos efeitos das proteínas Bt, por consumirem o pólen dessas plantas na sua dieta regularmente, do que outros predadores que utilizam pólen apenas como alimento alternativo à dieta a base de presa.

Embora exista uma divergência entre os resultados sobre os efeitos das plantas Bt aos inimigos naturais, existe um benefício incontestável da redução no uso de inseticidas nos sistemas agrícolas (Shelton et al. 2002; Lamichhane et al. 2016), que garante a manutenção desses organismos no sistema. Além disso, os predadores, assim como os parasitoides, contribuem para o controle de pragas resistentes a plantas Bt (Romeis et al. 2006). Neste estudo foi confirmada a existência de efeitos negativos para *E. annulipes* alimentada com pólen e lagartas de *S. frugiperda* em milho Bt, mas não foi observado efeito negativo quando o predador consumiu apenas lagartas de *S. frugiperda*. Contudo algumas perguntas não foram respondidas em nosso estudo, mas deveriam ser investigadas para compreensão dos impactos ecológicos dos resultados encontrados. Por exemplo: existe o sequestro das toxinas Bt em *E. annulipes*? Ocorre transferência dessas toxinas durante o cuidado materno (regurgitação) de *E. annulipes* às ninfas recém emergidas? Tais questões se justificam, haja vista que estudos anteriores comprovam o sequestro e transferência de proteínas Cry em predadores (Zhang et al. 2006; Paula et al. 2015, Paula et al. 2016).

5. Referências Bibliográficas

- Al-Deeb, M. A., Wilde, G. E., & Higgins, R. A. (2001). No effect of *Bacillus thuringiensis* corn and *Bacillus thuringiensis* on the predator *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae). *Environmental Entomology*, 30(3), 625-629.
- Ali, I., Zhang, S., Muhammad, M. S., Iqbal, M., & Cui, J. J. (2018). Bt Proteins Have No Detrimental Effects on Larvae of the Green Lacewing, *Chrysopa pallens* (Rambur) (Neuroptera: Chrysopidae). *Neotropical entomology*, 1-8.
- Andow, D. A., Lövei, G. L., & Arpaia, S. (2006). Ecological risk assessment for Bt crops. *Nature Biotechnology*, 24(7), 749.
- Bai, Y. Y., Jiang, M. X., & Cheng, J. A. (2005). Effects of transgenic cry1Ab rice pollen on fitness of *Propylea japonica* (Thunberg). *Journal of Pest Science*, 78(3), 123-128.
- Betz, F. S., Hammond, B. G., & Fuchs, R. L. (2000). Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32(2), 156-173.
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberon, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423-435.
- Clark, P. L., Molina-Ochoa, J., Martinelli, S., Skoda, S. R., Isenhour, D. J., Lee, D. J., Krumm, J. T., & Foster, J. E. (2007). Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in the Western Hemisphere. *Journal of Insect Science*, 7(1), 1-10.
- Cloyd, R. A., & Bethke, J. A. (2011). Impact of neonicotinoid insecticides on natural enemies in greenhouse and interiorscape environments. *Pest Management Science*, 67(1), 3-9.
- Coll, M., & Guershon, M. (2002). Omnivory in terrestrial arthropods: mixing plant and prey diets. *Annual review of entomology*, 47(1), 267-297.
- Duan, J. J., Marvier, M., Huesing, J., Dively, G., & Huang, Z. Y. (2008). A meta-analysis of effects of Bt crops on honey bees (Hymenoptera: Apidae). *PLoS One*, 3(1), e1415.

- Ferry, N., Mulligan, E. A., Stewart, C. N., Tabashnik, B. E., Port, G. R., & Gatehouse, A. M. (2006). Prey-mediated effects of transgenic canola on a beneficial, non-target, carabid beetle. *Transgenic Research*, 15(4), 501.
- Frizzas, M. R., Silveira Neto, S., Oliveira, C. M. D., & Omoto, C. (2014). Genetically modified corn on fall armyworm and earwig populations under field conditions. *Ciência Rural*, 44(2), 203-209.
- Han, P., Velasco-Hernández, M. C., Ramirez-Romero, R., & Desneux, N. (2016). Behavioral effects of insect-resistant genetically modified crops on phytophagous and beneficial arthropods: a review. *Journal of Pest Science*, 89(4), 859-883.
- Hansen, L. S., Lövei, G. L., & Székács, A. (2013). Survival and development of a stored-product pest, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), and its natural enemy, the parasitoid *Lariophagus distinguendus* (Hymenoptera: Pteromalidae), on transgenic Bt maize. *Pest Management Science*, 69(5), 602-606.
- Hellmich, R. L., Siegfried, B. D., Sears, M. K., Stanley-Horn, D. E., Daniels, M. J., Mattila, H. R., ... & Lewis, L. C. (2001). Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*-purified proteins and pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), 11925-11930.
- Hilbeck, A., Baumgartner, M., Fried, P. M., & Bigler, F. (1998). Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environmental Entomology*, 27, 480-487.
- Jesse, L. C. H. & Obrycki, J. J. (2000). Field deposition of Bt transgenic corn pollen: lethal effects on the monarch butterfly. *Oecologia*, 125, 241-248.
- Kasten Jr., P., Precetti, A. A. C. M., Parra, J. R. P. (1978). Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* em duas dietas artificiais e substrato natural. *Revista de Agricultura*, 53(1), 68-78.
- Klostermeyer, E. C. (1942). The life history and habits of the ringlegged earwig, *Euborellia annulipes* (Lucus) (Order Dermaptera). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 15(1), 13-18.

- Kocarek, P., Dvorak, L., & Kirstova, M. (2015). *Euborellia annulipes* (Dermaptera: Anisolabididae), a new alien earwig in Central European greenhouses: potential pest or beneficial inhabitant?. *Applied Entomology and Zoology*, 50(2), 201-206.
- Koelliker, M., & Vancassel, M. (2007). Maternal attendance and the maintenance of family groups in common earwigs (*Forficula auricularia*): a field experiment. *Ecological Entomology*, 32(1), 24-27.
- Koppenhofer, A. M. (1995). Bionomics of the earwig species *Euborellia annulipes* in Western Kenya (Dermaptera: Carcinophoridae). *Entomologia Generalis*, 20(1), 81–85
- Lamichhane, J. R., Dachbrodt-Saaydeh, S., Kudsk, P., & Messéan, A. (2016). Toward a reduced reliance on conventional pesticides in European agriculture. *Plant Disease*, 100(1), 10-24.
- Lawo, N. C., Wäckers, F. L., & Romeis, J. (2010). Characterizing indirect prey-quality mediated effects of a Bt crop on predatory larvae of the green lacewing, *Chrysoperla carnea*. *Journal of Insect Physiology*, 56(11), 1702-1710.
- Leite, N. A., Mendes, S. M., Santos, C. A., & Pereira, E. J. G. (2014). Does Cry1Ab maize interfere in the biology and behavioural traits of *Podisus nigrispinus*?. *Bulletin of Insectology*, 67(2), 265-271.
- Lemos, W. P., Ramalho, F. D. S., & Zanuncio, J. C. (2003). Age-dependent fecundity and life-fertility tables for *Euborellia annulipes* (Lucas) (Dermaptera: Anisolabididae) a cotton boll weevil predator in laboratory studies with an artificial diet. *Environmental entomology*, 32(3), 592-601.
- Lemos, W. (1997). *Biologia e exigências térmicas de Euborellia annulipes* (Lucas, 1847) (Dermaptera: Anisolabididae), predador do bicudo-do-algodoeiro. 1997, 132 p. Monografia (Trabalho de Graduação em Agronomia)–Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB: UFPB/CCA.

- Lemos, W. P., Medeiros, R. S., & Ramalho, F. S. (1998). Influência da Temperatura no Desenvolvimento de *Euborellia annulipes* (Lucas) (Dermaptera: Anisolabididae), Predador do Bicudo-do-Algodoeiro. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 27(1), 67-76.
- Losey, J. E., Rayor, L. S., & Carter, M. E. (1999). Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 399(6733), 214.
- Lövei, G. L., & Arpaia, S. (2005). The impact of transgenic plants on natural enemies: a critical review of laboratory studies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 114(1), 1-14.
- Lundgren, J. G., & Wiedenmann, R. N. (2002). Coleopteran-specific Cry3Bb toxin from transgenic corn pollen does not affect the fitness of a nontarget species, *Coleomegilla maculata* DeGeer (Coleoptera: Coccinellidae). *Environmental Entomology*, 31(6), 1213-1218.
- Lundgren, J. G. (2009). Nutritional aspects of non-prey foods in the life histories of predaceous Coccinellidae. *Biological Control*, 51(2), 294-305.
- Naranjo, S. E. (2009). Impacts of Bt crops on non-target invertebrates and insecticide use patterns. *Biocontrol News and Information*, 30(2), 1-23.
- Niu, L., Ma, Y., Mannakkara, A., Zhao, Y., Ma, W., Lei, C., & Chen, L. (2013). Impact of single and stacked insect-resistant Bt-cotton on the honey bee and silkworm. *PLoS One*, 8(9), e72988.
- Nonino, M. C., Pasini A., & VenturaIII, M. U. (2007). Atração do predador *Doru luteipes* (Scudder) (Dermaptera: Forficulidae) por estímulos olfativos de dietas alternativas em laboratório. *Ciência Rural*, 37(3).
- Pasini, A., Parra, J. R., & Lopes, J. M. (2007). Dieta Artificial para Criação de *Doru luteipes* (Scudder) (Dermaptera: Forficulidae), Predador da Lagarta-do-Cartucho do Milho, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology*, 36(2), 308-311.
- Paula, D. P., & Andow, D. A. (2016). Uptake and bioaccumulation of Cry toxins by an aphidophagous predator. *Environmental Pollution*, 209, 164-168.

- Paula, D. P., Souza, L. M., & Andow, D. A. (2015). Sequestration and Transfer of Cry Entomotoxin to the Eggs of a Predaceous Ladybird Beetle. *PloS one*, 10(12), e0144895.
- Peterson, J. A., Obrycki, J. J., & Harwood, J. D. (2016). Spiders from multiple functional guilds are exposed to Bt-endotoxins in transgenic corn fields via prey and pollen consumption. *Biocontrol Science and Technology*, 26(9), 1230-1248.
- Pilcher, C. D., Obrycki, J. J., Rice, M. E., & Lewis, L. C. (1997) Preimaginal development, survival, and field abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis* corn. *Environmental Entomology*, 26(2), 446–454.
- Rankin, S. M., Storm, S. K., Pioto, D. L., & Risser, A. L. (1996). Maternal behavior and clutch manipulation in the ring-legged earwig (Dermaptera: Carcinophoridae). *Journal of Insect Behavior*. 9(1), 85-104.
- Romeis, J., Bartsch, D., Bigler, F., Candolfi, M. P., Gielkens, M. M., Hartley, S. E., ... & Quemada, H. (2008). Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. *Nature Biotechnology*, 26(2), 203.
- Romeis, J., Meissle, M., & Bigler, F. (2006). Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature biotechnology*, 24(1), 63.
- Roulston, T. A. H., & Cane, J. H. (2000). Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant systematics and Evolution*, 222(1-4), 187-209.
- Schuldiner-Harpaz, T., & Coll, M. (2017). Estimating the effect of plant-provided food supplements on pest consumption by omnivorous predators: lessons from two coccinellid beetles. *Pest Management Science*, 73(5), 976-983.
- Shelton, A. M., Zhao, J. Z., & Roush, R. T. (2002). Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual review of entomology*, 47(1), 845-881.

- Shelton, A. M., Romeis, J., Naranjo, S., Tian, J., & Hellmich, R. (2016). Use of Bt-resistant caterpillars to assess the effect of Cry proteins on beneficial natural enemies. IOBC-WPRS Bulletin, 114(1), 51-55.
- Silva, A. B. D., Batista, J. D. L., & Brito, C. H. D. (2009). Capacidade predatória de *Euborellia annulipes* (Lucas, 1847) sobre *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797). Acta Scientiarum. Agronomy, 31(1), 7-11.
- Simpson, S. J., Clissold, F. J., Lihoreau, M., Ponton, F., Wilder, S. M., & Raubenheimer, D. (2015). Recent advances in the integrative nutrition of arthropods. Annual Review of Entomology, 60(1), 293-311.
- Tian, J. C., Long, L. P., Wang, X. P., Naranjo, S. E., Romeis, J., Hellmich, R. L., ... & Shelton, A. M. (2014). Using resistant prey demonstrates that Bt plants producing Cry1Ac, Cry2Ab, and Cry1F have no negative effects on *Geocoris punctipes* and *Orius insidiosus*. Environmental entomology, 43(1), 242-251.
- Tian, J. C., Wang, X. P., Long, L. P., Romeis, J., Naranjo, S. E., Hellmich, R. L., ... & Shelton, A. M. (2013). Bt crops producing Cry1Ac, Cry2Ab and Cry1F do not harm the green lacewing, *Chrysoperla rufilabris*. PloS One, 8(3), e60125.
- Tomé, M. P. Desenvolvimento e sobrevivência de *Euborellia annulipes* com dieta vegetal, animal e mista. 2018. Dissertação (Mestrado em CIÊNCIAS AGRÁRIAS) - Universidade Estadual da Paraíba, 32p.
- Vancassel, M. (1984). Plasticity and adaptive radiation of dermapteran parental behavior: results and perspectives. In Advances in the Study of Behavior, Vol. 14, pp. 51-80.
- Vilarinho, E. C., Fernandes, O. A., Hunt, T. E., & Caixeta, D. F. (2011). Movement of *Spodoptera frugiperda* adults (Lepidoptera: Noctuidae) in maize in Brazil. Florida Entomologist, 94(3), 480-488.

- Wang, Z. Y., Wu, Y., He, K. L., & Bai, S. X. (2007). Effects of transgenic Bt maize pollen on longevity and fecundity of *Trichogramma ostrinae* in laboratory conditions. *Bulletin of Insectology*, 60(1), 49.
- Wolfenbarger, L. L., Naranjo, S. E., Lundgren, J. G., Bitzer, R. J., & Watrud, L. S. (2008). Bt crop effects on functional guilds of non-target arthropods: a meta-analysis. *PLoS One*, 3(5), e2118.
- Zhang, G. F., Wan, F. H., Lövei, G. L., Liu, W. X., & Guo, J. Y. (2006). Transmission of Bt toxin to the predator *Propylaea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae) through its aphid prey feeding on transgenic Bt cotton. *Environmental Entomology*, 35(1), 143–150.
- Zhang, X., Li, Y., Romeis, J., Yin, X., Wu, K., & Peng, Y. (2014). Use of a pollen-based diet to expose the ladybird beetle *Propylea japonica* to insecticidal proteins. *PLoS One*, 9(1), e85395.
- Zwahlen, C., Hilbeck, A., Howald, R., & Nentwig, W. (2003) Effects of transgenic Bt corn litter on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Molecular Ecology*, 12(4), 1077–1086.

2. Considerações Finais

Spodoptera frugiperda é a espécie mais representativa nos levantamentos de campo, sendo que as lagartas são tolerantes aos híbridos transgênicos YieldGard e YieldGard VTPRO, no entanto sua população é suscetível ao híbrido Vipitera. Contudo, no híbrido Vipitera houve a ocorrência de três espécies de *Leucania* e três espécies de *Elaphria*, sendo esta a primeira citação desses gêneros em milho Bt no Brasil.

As populações de parasitoides e predadores foram afetadas negativamente nos híbridos YieldGard VTPRO e Vipitera em campo. Observamos parasitismo em lagartas de *S. frugiperda* e *Leucania*, mas não foi registrado parasitismo em lagartas de *Elaphria*.

Em laboratório o híbrido Vipitera causou 100% de mortalidade de *S. frugiperda*, no entanto, as lagartas sobreviveram aos híbridos Bt YieldGard e YieldGard VTPRO, no entanto esses híbridos apresentaram efeitos sub-letais no desenvolvimento e fecundidade de *S. frugiperda*.

Os híbridos transgênicos YieldGard e YieldGard VTPRO causaram maior mortalidade às lagartas de *S. frugiperda* parasitadas por *C. sonorensis* e alteraram o período de desenvolvimento larval, pupal, o peso das pupas e a fecundidade das fêmeas do parasitoide, em relação ao controle.

A sobrevivência do predador *E. annulipes*, em laboratório, foi menor para ninfas e adultos quando alimentados com dieta mista (pólen+lagartas de *S. frugiperda*), proveniente dos híbridos YieldGard e YieldGard VTPRO. Além disso, na dieta mista com esses híbridos alterou negativamente o tempo de desenvolvimento ninfal e o número de ovos produzidos.

3. REFERÊNCIAS

- ALTIERI, M. A. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. In: PAOLETTI, M. G. **Invertebrate Biodiversity as Bioindicators of Sustainable Landscapes**. Elsevier, 1999. p. 19-31.
- ANDREN, O.; PAUSTIAN, K.; & ROSSWALL, T. Soil biotic interactions in the functioning of agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 24, n. 1-3, p. 57-67, 1988.
- ANDREWS, K. L. Latin american research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida entomologist**, v. 71, n. 4, p. 630-653, 1988.
- ASHLEY, T. R. Geographical distributions and parasitization levels for parasitoids of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Florida Entomologist**, v. 69, n. 3, p. 516-524, 1986.
- AZEREDO, E. H.; PERRUSO, J. C.; MENEZES, E. B.; CASSINO, P. C. R. Utilização de *Brassica oleracea* (L.) como planta atrativa simultânea de *Myzus persicae* (SULZEI, 1776) e *Cycloneda sanguinea* (Linnaeus, 1763) em área de cultivo de batata (*Solanum uberosum* L.). **Revista Universidade Rural**, v. 24, n. 2, p. 89-95, 2004.
- BABU, R. M.; SAJEENA, A.; SEETHARAMAN, K.; REDDY, M. S. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management—an over view. **Crop Protection**, v. 22, n. 9, p. 1071-1086, 2003.
- BATES, S. L.; ZHAO, J. Z.; ROUSH, R. T.; SHELTON, A. M. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 57-62, 2005.
- BERNAL, J. S.; PRASIFKA, J.; SÉTAMOU, M.; HEINZ, K.M. (2004). Transgenic insecticidal cultivars in integrated pest management: challenges and opportunities. In: KOUL, P.; DHALIWAL, G.S.; CUPERUS, G.W. (Eds.). *Integrated Pest Management: Potential, Constraints and Challenges*. Wallingford, CABI Publusing, 2004, p. 123-145.
- BETZ, F. S.; HAMMOND, B. G.; FUCHS, R. L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n.2, p. 156-173, 2000.
- BLANCO, C. A.; CHIARAVALLE, W.; DALLA-RIZZA, M.; FARIAS, J. R.; GARCÍA-DEGANO, M. F.; GASTAMINZA, G.; MOTA-SANCHEZ, D.; MURÚA, M. G.; OMOTO, C.; PIERALISI, B. K.; RODRÍGUEZ, J.; RODRÍGUEZ-MACIEL, J. C.; TERÁN-SANTOFIMIO, H.; TERÁN-VARGAS, A. P.; VALÊNCIA, S. J.; WILLINK, E. Current situation of pests targeted by Bt crops in Latin America. **Current Opinion in Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 131-138, 2016.
- BOTTRELL, D. G.; SMITH, R. F. Integrated pest management. **Environmental Science & Technology**, v. 16, n. 5, p. 282A-288A, 1982.
- BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.
- CANNON, R. J. Bt transgenic crops: risks and benefits. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 5, n. 3, p. 151-173, 2000.

- CARDINALE, B. J.; HARVEY, C. T.; GROSS, K.; IVES, A. R. Biodiversity and biocontrol: emergent impacts of a multi-enemy assemblage on pest suppression and crop yield in an agroecosystem. **Ecology Letters**, v. 6, n. 9, p. 857-865, 2003.
- CASIDA, J. E. Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n.4, p. 609-619, 2009.
- CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide research: past, present, or future?. **Annual Review of Entomology**, v. 43, n. 1, p. 1-16, 1998.
- CATARINO, R.; CEDDIA, G.; AREAL, F. J.; PARK, J. The impact of secondary pests on *Bacillus thuringiensis* (Bt) crops. **Plant Biotechnology Journal**, v. 13, n. 5, p. 601-612, 2015.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, Safra 2018/19, v. 6, Sexto levantamento, Março de 2019.
- CORY, J. S.; FRANKLIN, M. T. Evolution and the microbial control of insects. **Evolutionary Applications**, v. 5, n. 5, p. 455-469, 2012.
- CURVO, H. R. M.; PIGNATI, W. A.; PIGNATTI, M. G. Morbimortalidade por câncer infantojuvenil associada ao uso agrícola de agrotóxicos no Estado de Mato Grosso, Brasil. **Cadernos de Saúde Coletiva**, v. 21, n. 1, p. 10-17, 2013.
- DEVINE, G. J.; FURLONG, M. J. Insecticide use: contexts and ecological consequences. **Agriculture and Human Values**, v. 24, n. 3, p. 281-306, 2007.
- DONOVAN, W. P.; ENGLEMAN, J. T.; DONOVAN, J. C.; BAUM, J. A.; BUNKERS, G. J.; CHI, D. J.; KRASOMIL-OSTERFELD, K. C. Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 4, p. 713-719, 2006.
- ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.
- FARIA, M. F.; LUNDFREN, J. G.; FONTES, E. M. G.; FERNANDES, O. A.; SCHMIDT, F.; VAN TUAT, N.; ANDOW, D.A. Assessing the effects of Bt cotton on generalista arthropod predators. In: HILBECK, A., ANDOW, D.A., FONTES, E.M.G. (Ed.) Environmental risk assessment of genetically modified organisms: methodologies for assessing Bt cotton in Brazil. Wallingford: CABI publishing, 2, 2006, p. 175-199.
- FRUTOS, R.; RANG, C.; ROYER, M. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 227-276, 1999.
- GATEHOUSE, J. A. Biotechnological prospects for engineering insect-resistant plants. **Plant Physiology**, v. 146, n. 3, p. 881-887, 2008.
- GOMEZ, V. A.; VILLALBA, G. E.; ARIAS, O. R.; RAMÍREZ, M. B.; GAONA, E. F. Toxicidad sobre *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) de la proteína Bt expresada en hojas de diferentes eventos de maíz transgénico liberados en Paraguay. **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, v. 76, n. 2, p. 1-10, 2017.

- GROSS JR, H. R.; PAIR, S. D. The fall armyworm: status and expectations of biological control with parasitoids and predators. **Florida Entomologist**, v. 69, n. 3, p. 502-515, 1986.
- HAILS, R. S. Genetically modified plants—the debate continues. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, n. 1, p. 14-18, 2000.
- HARVEY, J. A.; STRAND, M. R. The developmental strategies of endoparasitoid wasps vary with host feeding ecology. **Ecology**, v. 83, n. 9, p. 2439-2451, 2002.
- HARWOOD, J. D.; WALLIN, W. G.; OBRYCKI, J. J. Uptake of Bt endotoxins by nontarget herbivores and higher order arthropod predators: molecular evidence from a transgenic corn agroecosystem. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 9, p. 2815-2823, 2005.
- HLADIK, M. L.; KOLPIN, D. W.; KUIVILA, K. M. Widespread occurrence of neonicotinoid insecticides in streams in a high corn and soybean producing region, USA. **Environmental Pollution**, v. 193, n. 1, p. 189-196, 2014.
- HOBALLAH, M. E.; DEGEN, T.; BERGVINSON, D.; SAVIDAN, A.; TAMÒ, C.; TURLINGS, T. C. Occurrence and direct control potential of parasitoids and predators of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on maize in the subtropical lowlands of Mexico. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 6, n. 1, p. 83-88, 2004.
- HOOPER, D. U.; CHAPIN, F. S.; EWEL, J. J.; HECTOR, A.; INCHAUSTI, P.; LAVOREL, S.; LAWTON, J. H.; LODGE, D. M.; LOREAU, M.; NAEEN, S.; SCHIMID, B.; SERALA, H.; SYMSTAD, A. L.; VANDERMEER, J.; WARDLE, D. A. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. **Ecological Monographs**, v. 75, n. 1, p. 3-35, 2005.
- ISENHOUR, D. J. Developmental time, adult reproductive capability, and longevity of *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) as a parasitoid of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 79, n. 6, p. 893-897, 1986.
- JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. ISAAA Brief No. 52. ISAAA: Ithaca, NY. 2016.
- JAMES, C.; KRATTIGER, A. F. Global review of the field testing and commercialization of transgenic plants: 1986 to 1995. ISAAA Briefs, 1, 1996.
- KÉFI, S.; BERLOW, E. L.; WIETERS, E. A.; NAVARRETE, S. A.; PETCHEY, O. L.; WOOD, S. A.; MARTINEZ, N. D. More than a meal integrating non-feeding interactions into food webs. **Ecology Letters**, v. 15, n. 4, p. 291-300, 2012.
- KUMAR, S.; CHANDRA, A.; PANDEY, K. C. *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, n. 5, p. 641-653, 2008.
- LEE, M. K.; WALTERS, F. S.; HART, H.; PALEKAR, N.; CHEN, J. S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4648-4657, 2003.
- LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: AS-PTA—Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 1, 2011.

- LÖVEI, G. L.; ARPAIA, S. The impact of transgenic plants on natural enemies: a critical review of laboratory studies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 114, n. 1, p. 1-14, 2005.
- LUNDGREN, J. G. Relationships of natural enemies and non-prey foods (Vol. 7). **Science & Business Media: Springer**, 2009.
- MOLINA-OCHOA, J.; CARPENTER, J. E.; HEINRICHS, E. A.; FOSTER, J. E. Parasitoids and parasites of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas and Caribbean Basin: an inventory. **Florida Entomologist**, v. 86, n. 3, p. 254-289, 2003.
- MONQUERO, P. A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. **Bragantia**, v. 64, n. 4, p. 517-531, 2005.
- OKUMURA, R. S.; MARIANO, D. C.; DALLACORT, R.; ZORZENONI, T. O.; ZACCHEO, P. V. C.; NETO, C. F. O.; CONCEIÇÃO, H. E. O.; LOBATO, A. K. S. Agronomic efficiency of *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize hybrids in pest control in Lucas do Rio Verde city, State of Mato Grosso, Brazil. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 19, p. 2232–2239, 2013.
- OMOTO, C.; BERNARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R. J.; DOURADO, P. M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R. A.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n. 9, p. 1727-1736, 2016.
- ÖSTMAN, Ö.; EKBOM, B.; BENGTSSON, J. Yield increase attributable to aphid predation by ground-living polyphagous natural enemies in spring barley in Sweden. **Ecological Economics**, v. 45, n. 1, p. 149-158, 2003.
- PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, n. 12, p. 3296-3325, 2014.
- PROKOPY, R.; KOGAN, M. Integrated pest management. In Resh, V. H., Cardé, R. T. Encyclopedia of Insects, Second Edition, 2009, p. 523-528.
- RANG, C.; GIL, P.; NEISNER, N.; VAN RIE, J.; FRUTOS, R. Novel Vip3-related protein from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 6276-6281, 2005.
- RANJEKAR, P. K.; PATANKAR, A.; GUPTA, V.; BHATNAGAR, R.; BENTUR, J.; KUMAR, P. A. Genetic engineering of crop plants for insect resistance. **Current Science**, v. 84, n. 3, p. 321-329, 2003.
- REIS, L. L.; OLIVEIRA, L. J.; CRUZ, I. Biologia e Potencial de *Doru luteipes* no controle de *Spodoptera frugiperda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 333-342, 1988.
- RODERICK, G. K.; HUFBAUER, R.; NAVAJAS, M. Evolution and biological control. **Evolutionary Applications**, v. 5, n. 5, p. 419-423, 2012.
- ROMEIS, J.; BARTSCH, D.; BIGLER, F.; CANDOLFI, M. P.; GIELKENS, M. M.; HARTLEY, S. E.; HELLMICH, R.; HUESING, J. E.; JEPSON, P. C.; LAYTON, R.; QUEMADA, H.; RAYBOULD, A.; ROSE, R. I.; SCHIEMANN, J.; SEARS, M. K.; SHELTON, A. H.; SWEET, J.; VAITUZIS, Z.; WOLT, J. D. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 202- 203, 2008.

- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N. V.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.
- SCHULDINER-HARPAZ, T.; COLL, M. Estimating the effect of plant-provided food supplements on pest consumption by omnivorous predators: lessons from two coccinellid beetles. **Pest Management Science**, v. 73, n. 5, p. 976-983, 2017.
- SHELTON, A. M.; ZHAO, J. Z.; ROUSH, R. T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. **Annual Review of Entomology**, v. 47, n. 1, p. 845-881, 2002.
- SILVA, A. B. Bioecologia de *Euborellia annulipes* (Dermaptera: Anisolabididae). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 5, p. 55-61, 2015.
- SILVA, A. B.; DE LUNA BATISTA, J.; DE BRITO, C. H. Aspectos Biológicos de *Euborellia annulipes* (Dermaptera: Anisolabididae) alimentada com o pulgão *Hyadaphis foeniculi* (Hemiptera: Aphididae). **Revista Caatinga**, v. 23, n. 1, p. 21-27, 2010.
- STORER, N. P.; KUBISZAK, M. E.; KING, J. E.; THOMPSON, G. D.; SANTOS, A. C. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 3, p. 294-300, 2012.
- TABASHNIK, B. E.; CARRIÈRE, Y.; DENNEHY, T. J.; MORIN, S.; SISTERTSON, M. S.; ROUSH, R. T.; SHELTON, A. M.; ZHAO, J. Z. Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. **Journal of Economic Entomology**, v. 96, n. 4, p. 1031-1038, 2003.
- THULER, R. T.; BORTOLI, S. A. D.; GOULART, R. M.; VIANA, C. L. T. P.; PRATISSOLI, D. Interação tritrófica e influência de produtos químicos e vegetais no complexo: brássicas x traça-das-crucíferas x parasitóides de ovos. **Ciência e Agrotecnologia**, 32(4), 1154-1160, 2008.
- VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HÖFTE, H.; JANSSENS, S.; DE BEUCKELEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v. 328, n. 6125, p. 1-33, 1987.
- VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. Survey of natural enemies of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), in Cascavel region, PR, Brazil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, n. 2, p. 333-337, 1999.
- VAN LENTEREN, J. C. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl**, v. 57, n. 1, p. 1-20, 2012.
- WAQUIL, J. M.; DOURADO, P. M.; DE CARVALHO, R. A.; OLIVEIRA, W. S.; BERGER, G. U.; HEAD, G. P.; MARTINELLI, S. Manejo de lepidópteros-praga na cultura do milho com o evento Bt piramidado Cry1A. 105 e Cry2Ab2. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 12, p. 1529-1537, 2014.
- WILLIAMS, W. P.; BUCKLEY, P. M.; SAGERS, J. B.; HANTEN, J. A. Evaluation of Transgenic Corn for Resistance to Corn Earworm (Lepidoptera: Noctuidae), Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae), and Southwestern Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) in a Laboratory Bioassay. **Journal of Agricultural Entomology**, v. 15, n. 2, p. 105-112, 1998.

WYCKHUYS; K. A.; O'NEIL, R. J. Population dynamics of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) and associated arthropod natural enemies in Honduran subsistence maize. **Crop Protection**, v. 25, n. 11, p. 1180-1190, 2006.

YU, H. L.; LI, Y. H.; WU, K. M. Risk Assessment and Ecological Effects of Transgenic *Bacillus thuringiensis* Crops on Non-Target Organisms F. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 53, n. 7, p. 520-538, 2011.

YU, S. J. Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 84, n. 2, p. 135-142, 2006.

ZADOKS, J. C.; WAIBEL, H. From pesticides to genetically modified plants: history, economics and politics. **NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 48, n. 2, p. 125-149, 2000.